

MOLEKULARZYTOMETISCHE
CHARAKTERISIERUNG VON
NEOPLASIE-ASSOZIIERTEN
CHROMOSOMENBRUCHPUNKTEN IN REGIONEN
VON FRAGILE SITES

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Katja Behr
geboren am 5. September 1983 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat./ med. habil. Thomas Liehr, Jena
2. Prof. Dr. med. Thomas Wendt, Jena
3. PD Dr. Irmgard Verdorfer, Innsbruck/ Österreich

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Zytogenetik	5
2.1.1. Entwicklung der Zytogenetik	5
2.1.2. Bänderungszytogenetik	6
2.2. Molekulare Zytogenetik	7
2.2.1. Entwicklung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	7
2.2.2. Prinzip der FISH	8
2.2.3. Weitere Methoden der molekularen Zytogenetik: Comparative Ge- nomic Hybridization (CGH)	11
2.3. Fragile Sites	12
2.3.1. Common Fragile Sites und neoplasie-assoziierte Bruchpunkte	13
2.4. Fragestellung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Untersuchungsmaterial	15
3.1.1. Herkunft des Untersuchungsmaterials	15
3.1.2. Herstellung von Chromosomenpräparaten	18
3.1.3. Auftropfen der Suspension auf den Objektträger	21
3.2. Verwendete FISH-Sonden und deren Weiterverarbeitung	22
3.2.1. Verwendete FISH-Sonden	22
3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion	26
3.2.3. Nick-Translation	34
3.2.4. DNA-Fällung	35
3.3. Fluoreszenz in situ Hybridisierung	36
3.3.1. Pepsinbehandlung	36

Inhaltsverzeichnis

3.3.2.	Denaturierung	37
3.3.3.	Hybridisierung	40
3.3.4.	Waschung und Detektion	41
3.3.5.	Aufnehmen und Auswerten	43
4.	Ergebnisse	44
4.1.	Molekularzytogenetische Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte .	44
4.1.1.	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit exakter BAC-Kartierung .	45
4.1.2.	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit Teilkartierung	48
4.1.3.	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte ohne Kolokalisation mit Fragile Sites	55
4.2.	Datenbankanalysen	58
4.2.1.	Gene in den Bruchpunktregionen	58
4.2.2.	Sequenzanalyse	61
4.2.3.	Vergleichende Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte aus Literaturrecherchen mit Fragile Sites	62
5.	Diskussion	73
5.1.	Bruchpunktkartierung mittels FISH und BACs	73
5.2.	Vergleichende Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte und Fragile Sites	74
5.2.1.	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit exakter Kartierung	75
5.2.2.	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit Teilkartierung	79
5.2.3.	Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte ohne Kolokalisation mit Fragile Sites	83
5.2.4.	Zusammenfassender Vergleich der Lage der neoplasie-assoziierten Bruchpunkte und der Fragile Sites	84
5.3.	Vergleichende Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte aus Literaturrecherchen mit Fragile Sites	85
5.4.	Abstandsvergleich zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites	86
6.	Ausblick	88
Literaturverzeichnis		I
Elektronische Datenbanken		XVI

Inhaltsverzeichnis

A. Anhang	XVIII
Vergleich Tumorbruchpunkte und Fragile Sites	XVIII
Abstandsvergleich zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites	XXV
Auflistung aller genutzten BACs	XXVII
Vollständige Sequenzanalysen	XLIV
Genbeschreibungen ausgewählter Gene	XLVIII
Fragile Sites	L
Lebenslauf	LII
Danksagung	LIV
Ehrenwörtliche Erklärung	LVI

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Ak	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Aqua ad.	Aqua ad iniectabilia
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bio	Biotin-16-dUTP
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CCD-Kamera	charge-coupled device-Kamera (gekühlter, ladungsgekoppelter Bildungssensor)
cen/cep	Zentromer
cFS	common Fragile Sites
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Cy 5	Cyanin 5
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DD	Differentialdiagnose
DEAC	Diethylaminocoumarin-5-dUTP
dig	Digoxigenin-11-dUTP
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DOP	degenerierter Oligonukleotid-Primer
DOP-PCR	Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid-Primern
DS	Dextransulfat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Fragile Sites
GTG-Bänderung	Giemsa- Bänderung (G-bands by Trypsin using Giemsa)
G	Guanin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
ISIS	in situ Imaging Software (Metasystems)
kbp	Kilobasenpaare
KMT	Knochenmarktransplantation
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LINE	Long Interspersed Repetitive Element
LTR	Long Terminal Repeat
Mbp	Megabasenpaare
MCB	Multicolor-Banding
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
n.a.	nicht angegeben
OT	Objektträger (Einzahl)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

OTs	Objektträger (Mehrzahl)
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
pcp	partial chromosome painting
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
q	langer Arm eines Chromosoms
rFS	rare Fragile Sites
rpm	rounds per minute
RPMI-1640	Wachstumsmedium
SA	Strept-Avidin
SG	Spectrum Green
SINE	Short Interspersed Elements
SKY	Spectral Karyotyping
SO	Spectrum Orange-dUTP
SSC	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat
SSCT	Sodium Saline Citrat Tween 20
Stoffel-Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> mit Exonukleatsefunktion
T	Thymidin
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TR	Texas Red-12-dUTP
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
wcp	whole chromosome painting
Z.n.	Zustand nach

1. Zusammenfassung

Schon seit langem wird in der Literatur eine kausale Verbindung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte und Fragile Sites diskutiert, da diese häufig in derselben zytogenetischen Bande liegen. Es stellt sich die Frage, ob es sich auch auf DNA-Ebene um identische Bereiche handelt und ob man mit der Identifizierung dieser die zugrunde liegenden Mechanismen der Bruchentstehung entschlüsseln kann. Weiterhin ist unklar, ob es einen Zusammenhang zwischen Fragile Sites und der Entstehung von Tumorbruchpunkten gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden neoplasie-assoziierte Bruchpunkte in Chromosomen von Patienten mit Tumorerkrankungen und in Tumorzelllinien molekularzytogenetisch mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung und locus-spezifischen DNA-Sonden bestimmt und deren Lage mit bereits molekularzytogenetisch kartierten Fragile Sites verglichen. Es wurden Sequenzanalysen der Bruchpunktregionen durchgeführt und die dort lokalisierten Gene bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass fünf von elf neoplasie-assoziierten Bruchpunkten mit Fragile Sites kolokalisieren und ein weiterer eine fragliche Übereinstimmung zeigt, demnach etwa 50 % der in dieser Arbeit untersuchten neoplasie-assoziierten Bruchpunkte eine Übereinstimmung mit Fragile Sites aufweisen. Auch konnten keine tumorrelevanten Sequenzmotive oder Gene in den Bruchpunktbereichen identifiziert werden.

Weiterhin wurden 17 publizierte Tumorbruchpunkte mit bereits kartierten Fragile Sites verglichen, hierbei kolokalisierten zehn von 17 Bruchpunkten.

Es ließ sich zeigen, dass sich nur in einem Teil der neoplasie-assoziierten Bruchpunkte eine Übereinstimmung mit Fragile Sites findet, so dass davon auszugehen ist, dass Fragile Sites im Rahmen der Bruchpunktentstehung in Tumorzellen nur eine untergeordnete Funktion besitzen.

2. Einleitung

Seit etwa 30 Jahren, also mit Einführung der Bänderungszytogenetik (siehe auch Abschnitt 2.1.2), ist bekannt, dass chromosomale Veränderungen mit einer Vielzahl neoplastischer Erkrankungen in Zusammenhang stehen. Zuvor mutmaßte man als Ursachen für maligne Erkrankungen Umwelteinflüsse, Lebensweise, geschwächtes Immunsystem und auch Virusinfektionen. Heute sind die an der Tumorentstehung beteiligten Gene – Tumorsuppressorgene und Onkogene – grundsätzlich bekannt. Sie regulieren den Zellzyklus und gewährleisten das Gleichgewicht von Zellproliferation und Apoptose. Mutationen im Bereich dieser Gene können deren Funktion schwerwiegend beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass u.a. Punktmutationen, Amplifikationen, Deletionen und Translokationen die Entstehung einer klonal expandierten Tumorzelle bedingen können, so dass diese ungehemmt proliferieren und sich unter Missachtung jeglicher Grenzen ausbreiten kann (Hanahan und Weinberg 2000), da diese chromosomalen Rearrangements die Funktionen von ebendiesen Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Genen der Zellzyklusregulation beeinflussen (Nowell und Croce 1988, Gümüs et al. 2002). Solche Mutationen entstehen durch Instabilität der DNA oder auch durch fehlerhafte DNA-Reparatursysteme. Fragile Sites sind solche instabilen Regionen, da in diesen Bereichen die DNA-Synthese inhibiert wird und dadurch spontan oder unter bestimmten Kulturbedingungen gehäuft Brüche auftreten (Sutherland 1977)(siehe auch Abschnitt 2.3). DNA-Reparatursysteme erkennen und beseitigen solche Fehler im DNA-Strang vor Einleitung der Zellteilung bzw. schicken, sollte die Reparatur nicht gelingen, die Zelle in die Apoptose. Werden diese Fehler nicht erkannt, werden die Mutationen an die Tochterzellen weitergegeben.

Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte sind bisher überwiegend nur zytogenetisch charakterisiert (Mitelman et al. 2009). Zum besseren Verständnis der Pathogenese einer Tumorerkrankung ist aber eine exakte Sequenzanalyse der Bruchpunkte unumgänglich.

Schon zu Beginn der 1980er Jahre ließ sich ein Bezug von neoplasie-assoziierten Bruchpunkten zu Fragile Sites nicht von der Hand weisen: beide finden sich in den gleichen zytogenetischen Banden (Yunis und Soreng 1984, Hecht und Sutherland 1984, DeBraekeleer et al. 1985, DeBraekeleer 1987, LeBeau 1986). Auch für die Mehrzahl der Fragile

EINLEITUNG

Sites wurde bisher nur eine zytogenetische Kartierung erstellt, eine Sequenzanalyse steht noch weitgehend aus (siehe Abschnitt 2.3).

In dieser Arbeit sollte für ausgewählte neoplasie-assoziierte Bruchpunkte, die in zytogenetischen Regionen von Fragile Sites liegen, analysiert werden, ob diese auch auf molekularzytogenetischer Ebene übereinstimmen. Weiterhin wurde für ausgewählte Tumorbruchpunkte mittels einer Sequenzanalyse geprüft, ob im Bruchpunktbereich für die Tumorentstehung relevante Gene oder Promotoren liegen oder ob sich bestimmte Sequenzmotive mit pathogenetischer Bedeutung finden.

Es wurden mehrere Zellsuspensionen von Tumorpatienten und Tumorzelllinien mit zytogenetisch bereits bekannten Bruchpunkten, die in Fragile Sites-Regionen liegen, ausgewählt. Diese Bruchpunkte wurden im Rahmen dieser Arbeit molekularzytogenetisch kartiert und mit der Lage der entsprechenden Fragile Site verglichen. Weiterhin wurden die in den Bruchpunkten liegenden Gene identifiziert und für diese Bereiche datenbankgestützte Sequenzanalysen durchgeführt.

2.1. Zytogenetik

2.1.1. Entwicklung der Zytogenetik

Die erste Beschreibung menschlicher Chromosomen findet sich in der Literatur im Jahr 1879; Arnold hatte Chromosomen mit Hilfe des Lichtmikroskops darstellen können (Arnold 1879). Auch bei Flemming findet sich 1880 eine Beschreibung menschlicher Chromosomen, er bezeichnete die anfärbbare Struktur im Zellkern als „Chromatin“ (Flemming 1880). 1888 tauchte erstmals der Begriff „Chromosom“ bei Waldeyer auf, er benannte sie nach der griechischen Bedeutung für chroma: Farbe und soma: Körper (Waldeyer 1888). Die Relevanz der Chromosomen als Träger des Erbgutes erkannten 1903 Sutton und im gleichen Jahr Boveri. Sie entwickelten die „Chromosomentheorie der Vererbung“ (Boveri 1903) bzw. „The chromosome inherity“ (Sutton 1903).

Einer genaueren Betrachtung und Untersuchung wurden die Chromosomen erst 1956 zugänglich. Tijo und Levan hatten eine geeignete Methode zur Chromosomenpräparation entwickelt und konnten die korrekte Anzahl von 46 Chromosomen beim Menschen feststellen (Tijo und Levan 1956). Dem vorausgegangen waren Methodenentwicklungen zur Arretierung der Chromosomen im Metaphasestadium (Bayreuther 1952) und eine vorhergehende hypertone Behandlung der Zellen (Hsu 1952) zur besseren Darstellbarkeit der Chromosomen.

EINLEITUNG

Bereits im Jahr 1959 wurden die ersten numerischen Chromosomenveränderungen entdeckt. So beschrieben Lejeune die Trisomie 21 (Lejeune 1959), Jacobs und Strong das Klinefelter-Syndrom (Jacobs und Strong 1959) und Ford und Mitarbeiter das Turner-Syndrom (Ford et al. 1959). 1960 folgten Beschreibungen der Trisomie 13 (Patau et al. 1960) und Trisomie 18 (Edwards et al. 1960) und 1963 des Cri-du-Chat-Syndroms (Lejeune et al. 1963). Ebenfalls 1960 wurde die erste strukturelle Chromosomenaberration (Polani und Mitarbeiter zeigten eine Translokation der Chromosomen 13 und 21 bei einem Patienten mit Down-Syndrom (Polani et al. 1960)) und die erste erworbene Chromosomenaberration (Translokation der Chromosomen 9 und 22 (Philadelphia-Chromosom) bei chronisch myeloischer Leukämie (Nowell und Hungerford 1960)) gefunden.

2.1.2. Bänderungszytogenetik

Die Unterscheidung einzelner Chromosomen wurde erst durch die Entwicklung der Bänderungsverfahren möglich. Hierbei entstehen nach chemischer Behandlung der Chromosomen reproduzierbare, alternierend helle und dunkle Banden, welche die Chromosomen unterscheidbar und auch intra- und interchromosomale Veränderungen darstellbar machen.

Die erste Darstellung der Chromosomenbanden gelang mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Quinacrin (Q-Banding) (Caspersson et al. 1968, Caspersson et al. 1970). Seabright entwickelte die heutige Standardmethode der GTG-Bänderung (*G*-Bands by *T*rypsin using *G*iemsa), bei der vor Giemsa-Färbung mit Trypsin verdaut wird (Seabright 1971). Es folgten das R-Banding (vor Behandlung mit Giemsa erfolgt eine Salzsäuredenaturierung), welches ein reverses Bandenmuster zum GTG-Banding ergibt (Dutrillaux und Lejeune 1971). Darüber hinaus wurde das C-Banding entwickelt, das heterochromatische Bereiche anfärbt (Arrighi und Hsu 1971).

Wie eingangs bereits erwähnt, konnte mit Hilfe dieser Bänderungsverfahren eine exaktere Unterscheidung und Strukturanalyse der Chromosomen umgesetzt werden. Es ließen sich nun Translokationen (Austausch chromosomalen Materials zwischen den Chromosomen), Duplikationen (Verdoppelung chromosomalen Materials), Inversionen (intrachromosomale Umbauten) und Deletionen (Verlust chromosomalen Materials) darstellen.

Die zur Beschreibung dieser und vieler weiterer chromosomaler Umbauten nötige Nomenklatur wurde im immer wieder aktualisierten „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN) (Shaffer und Tommerup 2005) zusammengefasst. Es wurden die nach GTG-Banding entstehenden Bandenmuster zur Grundlage genom-

men und die Banden durchnummeriert. Weiterhin wurden die Bezeichnungen aller denkbaren Chromosomen- und Karyotypveränderungen festgelegt.

Doch auch dieser Methode sind Grenzen gesetzt. Die Genauigkeit der zytogenetischen Charakterisierung eines Bruchpunktes ist auf eine Bruchpunktgröße von minimal 5-10 Mbp begrenzt, so dass eine Weiterentwicklung der zytogenetischen Methoden in Form der molekularen Zytogenetik notwendig wurde, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird (Claussen et al. 2002).

2.2. Molekulare Zytogenetik

2.2.1. Entwicklung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die FISH ermöglicht die sehr spezifische Markierung bestimmter Chromosomen und Chromosomenabschnitte im biologischen Material (in situ).

Die erste Anwendung findet sich 1969 bei Pardue und Gall, welche radioaktiv markierte RNA zur Hybridisierung nutzten (Pardue und Gall 1969). 1981 ließen sich erstmals Gene mit radioaktiv markierten Sonden darstellen (Malcolm et al. 1981, Harper und Saunders 1981, Gerhard et al. 1981). Zu dieser Zeit wurde langsam die radioaktive Markierung durch andere Detektionssysteme abgelöst. So wurde erstmals 1986 das FITC-Avidin-Detektionssystem für Biotin an menschlichen Chromosomen eingesetzt (Pinkel et al. 1986). Im Laufe der Weiterentwicklung der FISH gab es ab 1986 die ersten Zweifarben-FISH-Experimente (Hopman et al. 1986). 1996 konnten mit der Entwicklung des SKY (Spectral Karyotyping) und des M-FISH (Multiplex-FISH) alle Chromosomen gleichzeitig dargestellt werden, da bei diesen Techniken verschiedenen Fluorochrome kombiniert werden können (Schröck et al. 1996, Speicher et al. 1996). Beide Methoden werden u.a. zur genaueren Eingrenzung chromosomaler Bruchpunkte in der Tumorzytogenetik eingesetzt (Veldman et al. 1997, Fleischman et al. 1999, Hilgenfeld et al. 1999, Mohr et al. 2000).

Als weiterer großer Schritt in der FISH-Methodik sollte das Multicolor-Banding (MCB) erwähnt werden (Chudoba et al. 1999, Liehr et al. 2002, Weise et al. 2008). Dies ist das derzeit best evaluierte und am häufigsten angewandte FISH-Bänderungsverfahren (Liehr et al. 2006), welches das gesamte Chromosom in Falschfarben in Form von Banden darstellt. Es wurde in seiner Weiterentwicklung als multitude MCB (mMCB) angewandt, zu dessen Herstellung die MCB-Sonden aller Chromosomen in einem Probenet vereinigt wurden (Weise et al. 2003).

2.2.2. Prinzip der FISH

Bei Anwendung der FISH werden direkt oder indirekt (über Haptene wie Biotin oder Digoxigenin) mit Fluorochromen markierte DNA-Sonden in situ, also an, auf dem Objektträger befindliche Chromosomen, hybridisiert.

Die Herstellung der Sonden erfolgt mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1985) unter Einsatz von degenerierten Oligonukleotiden (DOP-PCR) (Telenius et al. 1992) oder mittels Nick-Translation (Rigby et al. 1977) (siehe dazu auch Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3).

Sowohl die DNA-Sonden als auch die Chromosomen müssen vor Hybridisierung denaturiert werden. Nur so kann sich die Proben-DNA an die chromosomale DNA anlagern (siehe Abschnitt 3.3.2). Direkt markierte Sonden lassen sich nun bereits auswerten, indirekt markierte Sonden müssen zuvor mit fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert werden (siehe dazu auch Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4).

Die Abbildung 2.1 zeigt schematisch das Prinzip der FISH auf.

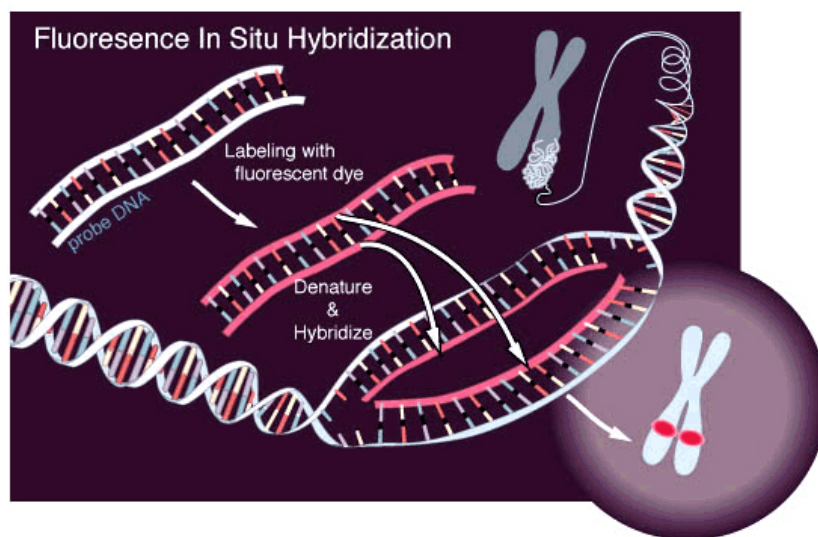


Abbildung 2.1.: Schema der FISH: Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Proben-DNA sowie die Ziel-DNA auf dem Chromosom werden denaturiert. Bei der Hybridisierung lagert sich die Proben-DNA an die homologe chromosomale DNA-Sequenz an und erzeugt ein Fluoreszenzsignal an spezifischer Stelle (Abbildung: Access Excellence Resource Center, www.accessexcellence.org).

EINLEITUNG

Entsprechend der Fragestellung kommen verschiedene Sondentypen zum Einsatz:

Chromosomen-Sonden

Hiermit lassen sich das gesamte Chromosom (whole chromosome painting, wcp) oder der kurze bzw. lange Arm eines Chromosoms (partial chromosome painting, pcp) markieren. Die Herstellung der Sonden erfolgt mittels „chromosome flow sorting“ (Speicher et al. 1996) oder Mikrosezierung (Senger et al. 1997).

Repetitive DNA-Sonden

Diese Sonden hybridisieren an Bereiche des Chromosoms, in denen eine vielfache Wiederholung der DNA-Sequenz vorliegt, zu finden in den Zentromer-Regionen, in den Telomeren und im Heterochromatin (Liehr und Claussen 2002).

Locus-spezifische Sonden

Diese Sonden werden zur Markierung definierter DNA-Sequenzen, einzelner Gene oder Chromosomenbanden genutzt (Liehr und Claussen 2002, Liehr et al. 2004). Sie bestehen aus exakt festgelegten Basenabfolgen und eignen sich daher optimal für Kartierungsarbeiten. Die spezifische DNA wird zur Klonierung in einen Vektor eingebaut und mit Hilfe eines Wirtsorganismus vermehrt. Die nähere Beschreibung der weiteren Aufarbeitung zur FISH-Sonde findet sich in Abschnitt 3.2. Es stehen verschiedene Vektoren zur Verfügung, entsprechend welche DNA-Menge man klonieren möchte. Nachfolgend einige Beispiele: Virale Vektoren (z.B. Adenoviren), Cosmide (Lambda-Phage, 0,003-0,004 Mbp), Plasmide (z.B. *Escherichia coli*, bis 0,3 Mbp), künstliche Chromosomen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, 0,2-2 Mbp) (Sambrook et al. 1989).

Als Locus-spezifische Sonden wurden in dieser Arbeit BACs (bacterial artificial chromosomes) genutzt (nähere Erläuterungen hierzu siehe Abschnitt 3.2.1). Mit Hilfe des NCBI Map Viewers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>), welches die Ergebnisse des „Human Genome Projects“ (<http://www.gdb.org/hugo/>) verarbeitet, lassen sich für nahezu jede Region des menschlichen Genoms BACs finden. Diese kann man dann kommerziell erwerben und wie bereits erläutert zu FISH-Sonden aufarbeiten.

2.2.3. Weitere Methoden der molekularen Zytogenetik: Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Erstmals beschrieben von Kallioniemi und Mitarbeitern (Kallioniemi et al. 1992), ermöglicht dieses Verfahren eine Analyse des chromosomalen Materials des gesamten Genoms. Hierbei wird spezifisch markierte DNA eines Gewebes (Tumorgewebe) gemeinsam mit wiederum unterscheidbar markierter gesunder DNA auf Metaphasechromosomen eines gesunden Karyotyps hybridisiert. Die DNA-Sonden konkurrieren nun um die Bindungsstellen der Chromosomen. Weist das Tumormaterial Verluste oder Zugewinne des chromosomalen Materials auf, dann ist dies an den schwächeren oder stärkeren FISH-Signalen der Tumor-DNA-Sonden auf den Chromosomen ersichtlich (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993). Entsprechende Software berechnet die Intensitätsprofile der Sonden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch nicht teilungsaktive Gewebe einer molekularzytogenetischen Analyse zugänglich werden, wobei jedoch balancierte Veränderungen (z.B. balancierte Translokationen, Inversionen und Insertionen), bei denen weder Verlust noch Zugewinn chromosomalen Materials vorliegen, mittels CGH nicht detektiert werden können.

Array CGH meint die comparative genomische Hybridisierung auf einem DNA Chip und steht für die neueste Entwicklung auf dem Gebiet der Zytogenetik. Bei diesem Verfahren wird Patienten-DNA auf einen mit DNA-Stücken beschichteten Chip hybridisiert, die das gesamte Genom in einem Abstand von weniger als einer Megabase abdecken. Dies erlaubt eine nahezu 10- bis 20-fache Verbesserung der Auflösung im Vergleich zur erreichbaren Auflösung der konventionellen CGH. Diese Methodik wird zur Bruchpunktcharakterisierung bei klinischen Fällen und bei Tumorerkrankungen verwendet (Selzer et al. 2005, Watson et al. 2007).

2.3. Fragile Sites

Als Fragile Sites werden zytogenetisch sichtbare Brüche („gaps“) in bestimmten chromosomalen Regionen bezeichnet, die spontan oder nach Induktion auftreten (erstmals beschrieben 1965 (Dekaban 1965)). Man unterscheidet common und rare Fragile Sites. Rare Fragile Sites werden in vitro durch Folat- und Thymidinmangel induziert und finden sich in weniger als 5% der Bevölkerung. Common Fragile Sites sind erzeugbar unter Thymidilat- und Folatstress (Hemmung der DNA-Replikation) oder unter Aphidicolin-zugabe (hemmt spezifisch DNA-Polymerasen α (Sheaff et al. 1991), δ (Byrnes 1984) und

EINLEITUNG

ϵ (Cheng und Kuchta 1993) während der Kultivierung (Glover et al. 1984, Casper et al. 2002)).

Im Bereich der Fragile Sites tritt eine partielle DNA-Replikationsinhibierung auf. Es finden sich hier Deletionen und Translokationen (Glover und Stein 1988, Wang et al. 1997), Austausch von Schwester-Chromatiden (Glover und Stein 1987, Lukusa et al. 1991), intrachromosomale Genamplifikationen (Coquelle et al. 1997) und Integration von Virus-DNA (Rassool et al. 1991). Bei Tumorerkrankungen finden sich im Bereich der Fragile Sites ebenfalls Deletionen (Arlt et al. 2002, Denison et al. 2003) und Translokationen (Krummel et al. 2000).

Bei der molekularzytogenetischen Kartierung von Fragile Sites zeigte sich wiederholt, dass man dieselben Fragile Sites innerhalb einer zytogenetischen Bande molekularzytogenetisch an verschiedenen Stellen auffindet, so z.B. bei FRA7B (in 7p22 sowohl bei 5.915 kbp (Ruiz-Herrera et al. 2004) als auch bei 3.527 bis 5.845 kbp (Mrasek 2009)) und FRA16C (in 16q22 sowohl bei 63.914 kbp (Zlotorynski et al. 2003) als auch bei 68.592 bis 72.036 kbp (Mrasek 2009)). Offensichtlich gibt es bei Fragile Sites eine gewisse Variabilität in der Lokalisation. Sie finden sich nicht unweigerlich an gleicher molekulargenetischer, aber gehäuft in bestimmten zytogenetischen Banden (Pedersen und Jensen 1991, Callahan et al. 2003, Mrasek 2009).

2.3.1. Common Fragile Sites und neoplasie-assoziierte Bruchpunkte

Wie bereits erwähnt, wurde schon zu Beginn der 1980er Jahre gezeigt, dass common Fragile Sites und neoplasie-assoziierte Bruchpunkte in gleichen zytogenetischen Bereichen liegen (Yunis und Soreng 1984, Hecht und Sutherland 1984, DeBraekeleer et al. 1985, DeBraekeleer 1987, LeBeau 1986), so dass angenommen wird, dass es eine ursächliche Verbindung zwischen beiden Beobachtungen gibt.

So beschrieben Yunis und Soreng 1984, dass etwa 50% der neoplasie-assoziierten Bruchpunkte von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren in den zytogenetischen Banden von Fragile Sites liegen (Yunis und Soreng 1984). So liegt z.B. in der Bande der common Fragile Site FRA5A (in 5p13) häufig eine Deletion oder Translokation bei der Promyelozytenleukämie und auch bei der chronisch myeloischen Leukämie (Miró et al. 1987). Ebenso findet sich der häufig beim Burkitt-Lymphom auftretende Bruchpunkt der Translokation t(8;14) innerhalb oder nahe der common Fragile Site FRA8C (Croce und Nowell 1985). Im Bereich der Fragile Site FRA16D liegen die sogenannten WWOX-

EINLEITUNG

Gene. Liegt für diesen Bereich eine homozygote Deletion vor, resultiert eine veränderte Expression. In vivo inhibieren diese Gene das Tumorwachstum von Brustkrebszellen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich Tumorsuppressorgene auch in Regionen von Fragile Sites finden (Bednarek et al. 2001, Ludes-Meyers et al. 2003, Pluciennik et al. 2006).

2.4. Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Überprüfung der in der Einleitung beschriebenen fraglichen Übereinstimmung der molekularzytogenetischen Lage von Fragile Sites und neoplasie-assoziierten Bruchpunkten. Anhand der Untersuchung von Chromosomenpräparaten ausgewählter Tumorpatienten und Tumorzelllinien werden folgende Fragen bearbeitet:

1. Gibt es den in der Literatur postulierten Zusammenhang zwischen Fragile Sites und neoplasie-assoziierten Bruchpunkten und somit der Tumorentstehung?
2. Gibt es in den neoplasie-assoziierten Bruchpunkten Gene und/oder Sequenzmotive, die als ursächlich für eine maligne Karyotyptransformation angesehen werden können?

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

3.1.1. Herkunft des Untersuchungsmaterials

Herkunft der Chromosomenpräparate aus Blut bzw. Knochenmark

Die in dieser Arbeit verwendeten Chromosomenpräparate wurden überwiegend von der tumorzytogenetischen Abteilung des Institutes für Humangenetik Jena aufgearbeitet und befundet. Es handelt sich hierbei in allen Fällen um zytogenetisch aufgearbeitetes Blut bzw. Knochenmark von Patienten mit Leukämieerkrankungen. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Diagnosen der untersuchten Fälle. Die Suspensionen wurden nach Standardmethoden (Verma und Babu 1994) präpariert.

Fallnummer	Diagnose	Gewebe
95156	V.a. MPS	KM
98211	V.a. anaplastische Anämie DD MDS	KM
99249	MDS	KM
01251	AML, Z.n. KMT	KM
04336	V.a. MDS	Blut
04758	ALL, Z.n. KMT	KM
05456	AML	Blut
06088	V.a. AML	KM
07134	V.a. AML	KM

Tabelle 3.1.: Diagnosen der Patienten

MATERIAL UND METHODEN

Zur Testung der hergestellten BAC-Sonden (siehe Abschnitt 3.2) wurden Chromosomenpräparate von drei gesunden Kontrollpersonen genutzt (zwei weibliche und ein männlicher Proband).

Herkunft der Zelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien waren bereits im Institut für Humangenetik Jena vorhanden und wurden freundlicherweise von verschiedenen Abteilungen zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien wurden nach Standardmethoden (Verma und Babu 1994) präpariert.

Die Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die einzelnen verwendeten Zelllinien und gibt an, aus welchen Referenzen die Daten zur Karyotypisierung der Zelllinien gewonnen wurden.

Zelllinie	Tumorart	Alter Patient	Geschlecht Patient	Referenz
A-431	Epidermoidkarzinom	85 J.	weiblich	(Pedrazzini et al. 2003)
COLO-320	Adenokarzinom des Sigmoids	55 J.	weiblich	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
Granta-519	B-Zell-Lymphom	58 J.	weiblich	(Rudolph et al. 2006)
HT-29	Adenokarzinom des Colons	44 J.	weiblich	(Kuechler et al. 2003)
LNCaP	Lymphknoten-metastase eines Prostatakarzinoms	55 J.	männlich	(Weise et al. 2003)
MTX 140	akute lymphoplastische Leukämie	3 J.	weiblich	(Weise et al. 2002)
NCEB-1	Mantelzell-Lymphom	57 J.	männlich	(Rudolph et al. 2006)
SAOS-2	Knochensarkom	11 J.	weiblich	(Ozaki et al. 2003)

Tabelle 3.2.: Herkunft und Referenzen der Zelllinien

3.1.2. Herstellung von Chromosomenpräparaten

Reagenzien zur Herstellung der Chromosomenpräparate

RPMI 1640 (Zellkulturmedium):

500 ml RPMI 1640 mit Glutamat-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco)

60 ml fetales Kälberserum (FKS, Biochrom KG)

5,0 ml Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 U/ml) (Biochrom KG)

Phytohämagglutinin (PHA):

lyophilisiertes PHA (Seromed) in 5 ml Aqua ad iniectabilia gelöst und aliquotiert

Colcemid (Seromed)

Kaliumchlorid-Lösung (hypoton):

0,559 g KCl (Merck) in 100 ml Aqua ad dest. (Braun)

Fixativ:

Methanol (Merck) zu Eisessig (Merck) im Verhältnis 3: 1

Herstellung von Chromosomenpräparaten aus Blut

In eine sterile Kulturflasche (Cellstar, Greiner) werden 10 ml RPMI 1640 und 10 μ l Phytohämagglutinin (PHA, gewonnen aus der Bohne *Phaseolus vulgaris*; Mitogen, welches spezifisch T-Lymphozyten zur Mitose anregt) vorgelegt. Es werden nun 1 ml des heparinisierten Blutes zugegeben, von dem die Suspension hergestellt werden soll. Die Kultur wird für die folgenden 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

90 Minuten vor Beenden der Kultivierung werden 100 μ l Colcemid (Seromed) zugegeben. Colcemid, aus *Cholcium autumnale* (Herbstzeitlose) gewonnen, hemmt den Aufbau des Spindelapparates, so dass alle zu diesem Zeitpunkt in der Mitose befindlichen Zellen im Metaphasezustand arretiert werden. Nun werden die Kulturflaschen vorsichtig geschüttelt, so dass sich sämtliche Zellen vom Boden lösen. Die Kultur wird dann in 14-ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgenommen und 10 ml einer 37°C- warmen hypotonen KCl-Lösung hinzugefügt. Durch kräftiges Schütteln wird der Rückstand resuspendiert und die Kultur wird für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Infolge dieser Hypotoniebehandlung zerplatzen die Erythrozyten, wobei die Lymphozyten und deren Kerne nur anschwellen, was später den Chromosomen eine bessere Spreitung erlaubt.

Darauf folgend wird 1 ml 4°C- kaltes Fixativ zugegeben, dadurch wird das Zellsediment fixiert und gereinigt. Es erfolgt erneut eine Zentrifugation für 5 Minuten bei

MATERIAL UND METHODEN

1500 U/min, wodurch die hämolysierten Erythrozyten in den Überstand gelangen, der dann verworfen wird. Es werden wiederum 10 ml Fixativ zum Pellet gegeben und nochmals zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird noch zweimal wiederholt. Entsprechend der Dichte des Sediments kann die Suspension durch Zugabe von Fixativ noch verdünnt werden. Nach Beendigung der Waschschrift wird die Suspension für mindestens 30 Minuten bei -20°C oder über Nacht im Kühlschrank belassen.

Nun kann die Suspension genutzt oder weiterhin bei -20°C gelagert werden (bei -20°C wird die DNA-schädigende Wirkung des Fixativs möglichst gering gehalten).

Herstellung von Chromosomenpräparaten aus Knochenmark

Das mit Heparin versetzte Knochenmark, von dem die Zellsuspension hergestellt werden soll, wird mit RPMI 1640 in einer sterilen Kulturflasche (Greiner, Cellstar) auf 12 ml aufgefüllt. Entsprechend der Verdachtsdiagnose bezüglich der Leukämieerkrankung des Patienten wird die Kultur bei 37°C im Brutschrank über 24 Std. bis zu 120 Std. inkubiert.

Nach der Kultivierung werden die Zellen durch leichtes Schütteln vom Boden der Kulturflasche gelöst und 100 µl Colcemid zugegeben. Es erfolgt erneut eine Kultivierung für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Im Anschluss wird die Kultur in 14-ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und es werden 10 ml hypotone KCl-Lösung zugefügt. Zum Resuspendieren wird die Kultur kräftig aufgeschüttelt und dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wird 1 ml 4°C-kaltes Fixativ zugegeben, alles aufgeschüttelt und für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird drei- bis viermal wiederholt, bis das Sediment farblos bzw. weiß ist. Bei sehr dichtem Sediment kann zur Verdünnung Fixativ zugegeben werden. Nach dem letzten Waschschrift wird die Suspension mindestens 45 Minuten bei -20°C inkubiert und kann danach genutzt oder weiterhin bei -20°C gelagert werden.

Herstellung von Chromosomenpräparaten aus Zelllinien

Die Zelllinien wurden ebenfalls nach Standardmethoden (Verma und Babu 1994) im Institut für Humangenetik Jena aufgearbeitet.

Die Zelllinien werden in RPMI 1640 kultiviert, zur Arretierung wird Colcemid und darauf folgend zur Hypotoniebehandlung KCl-Lösung zugegeben, anschließend wird zur Waschung Fixativ eingesetzt (wie oben bereits beschrieben).

3.1.3. Auftropfen der Suspension auf den Objektträger

Zu Beginn werden Objektträger mit Seidenpapier gereinigt und in eine Küvette mit 4°C-kaltem Aqua dest. gestellt. Weiterhin bereitet man eine feuchte Kammer vor, die im 60°C-Brutschrank erwärmt wird.

Die gekühlten Objektträger werden nun schräg in die feuchte Kammer gestellt, so dass ein Mikroklima mit hoher Luftfeuchtigkeit entsteht (Spurbeck et al. 1996). Die Suspension wird auf die Objektträger getropft. Nach kurzer Antrocknung wird Fixativ auf den Objektträger gegeben, somit werden Plasmarestes weggespült und die Chromosomen fixiert. Das Methanol verdunstet und die Essigsäure bewirkt durch ihre stark hygroskopische Wirkung die Aufnahme von Wasser aus der Umgebungsluft und führt somit zu einer Spreitung und damit Sichtbarmachung der Chromosomen (Claussen et al. 2002).

Danach werden die Objektträger zum Trocknen auf die auf 53°C vorgeheizte Heizplatte gelegt. Sind sie getrocknet, durchlaufen sie zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 3 Minuten 70%, 95% und 100% Ethanol).

Zur „Alterung“ werden die Objektträger zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur gelagert oder über Nacht im 60°C-Brutschrank belassen. Dann können sie genutzt oder weiterhin bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

3.2. Verwendete FISH-Sonden und deren Weiterverarbeitung

3.2.1. Verwendete FISH-Sonden

Reagenzien zur Herstellung der BAC-basierenden DNA-Sonden

Antibiotika:

Chloramphenicol: 34 mg/ml (Stammkonzentration) in Ethanol bei -20°C lagern

Endkonzentration: 20 µg/ml für RP11- und RP13-Klone

Kanamycin: 45 mg/ml (Stammkonzentration) in Aqua dest. bei -20°C lagern

Endkonzentration: 25 µg/ml für RP1-, RP4-, RP5-Klone

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

10 g Bacto-Trypton oder Pepton (Merck)

10 g NaCl (Roth)

5 g Bacto-Yeast-Extrakt (Merck)

in 900 ml Aqua dest. lösen, pH mit 10 M NaOH (ca. 200 µl) auf 7,0 einstellen

Volumen auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen und autoklavieren

MATERIAL UND METHODEN

Je nach Fragestellung sind verschiedene Sonden notwendig. Sie werden überwiegend am Institut für Humangenetik Jena wie nachfolgend beschrieben hergestellt.

BAC-Sonden

Dank des Humanen Genomprojektes sind BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) als Hilfskonstrukte zur Sequenzierung des menschlichen Genoms für nahezu jede Region der menschlichen Chromosomen verfügbar. BACs sind modifizierte Fertilitätsplasmide des Bakterienstammes *Escherichia coli* mit inserierten Fragmenten einer maximalen Größe von 300 kb (Shizuya et al. 1992).

Die in dieser Arbeit verwendeten BACs wurden sowohl von Prof. Rocchi/Bari, Italien zur Verfügung gestellt als auch käuflich über CHORI (Childrens Hospital Oakland Research Institute, Oakland, USA) erworben. Ein Teil der BAC-Sonden waren auch schon am Institut für Humangenetik Jena aus früheren Arbeiten vorhanden.

Die Isolierung von BAC-DNA wird mit einem kommerziellen Kit der Firma QIAGEN durchgeführt: Nach alkalischer Lyse der Bakterien folgt eine Adsorption der DNA an eine Silicat-Gel-Membran unter Hochsalzbedingungen.

Die bestellten *E.coli*-Klone (des apathogenen Sicherheitsstammes K12) werden in Agarose versandt und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert.

Die Kultivierung und Isolation wird im S1-Labor (Sicherheitslabor der Stufe 1 zur gentechnischen Arbeit mit Mikroben, die ohne Gefahr für gesunde Menschen und die Umwelt sind) unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die BACs enthalten Antibiotikaresistenzen, wodurch sich nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Chloramphenicol oder Kanamycin) in das Medium nur die gewünschten Klone vermehren können.

Zunächst muss die *E.coli*-Kultur, die das gewünschte BAC enthält, kultiviert werden. Dazu werden 6 ml LB-Medium und das entsprechende Antibiotikum in ein 50-ml-Röhrchen (Falcon) vorgelegt. Mit Hilfe eines autoklavierten Zahnstochers wird der Klon angeimpft und danach für ca. 16 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler (bei ca. 200 U/min) belassen.

Nach Beenden der Kultivierung wird für ca. 10 Minuten bei 2.800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert. In diesem Puffer ist tRNAse enthalten, welche tRNA abbaut. Danach wird zunächst 250 µl P2-Puffer zugegeben und vorsichtig geschwenkt. In diesem Schritt wird die Zellmembran lysiert und Proteine, chromosomale und BAC-DNA denaturiert.

MATERIAL UND METHODEN

Darauf folgend wird 350 μ l N3-Puffer zugefügt und ebenfalls leicht geschwenkt. Dieser Puffer stellt Hochsalzbedingungen her und neutralisiert den pH-Wert. Weiterhin werden Proteine, chromosomale DNA und Zellreste präzipitiert. Nun erfolgt eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 U/min. Der Überstand, in dem sich nun die BAC-DNA befindet, wird abgenommen und auf die QIAprep spin column (Eppendorfgefäß mit Säule) gegeben. Die Säule wird für eine Minute bei 4.000 U/min zentrifugiert.

Mit 0,5 ml PB-Puffer wird die Säule gewaschen und erneut für eine Minute bei 4.000 U/min zentrifugiert. Ein zweiter Waschschriff mit 0,75 ml PE-Puffer und eine Zentrifugation von einer Minute bei 4.000 U/min schließt sich an. Während dieser Waschschriffe werden Endonukleasen und Salze entfernt. Eine zusätzliche Zentrifugation bei 13.000 U/min für eine Minute entfernt die Waschpuffer.

Die Säule wird nun in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß gestellt. Nach Zugabe von 50 μ l Aqua bidest. wird die Säule für eine Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert, wobei die DNA von der Säule eluiert wird.

Die so gewonnene BAC-DNA kann bei -20°C dauerhaft gelagert werden. Mittels eines Photometers kann nun noch der DNA-Gehalt bestimmt werden.

Mikrosezierungssonden

Durch Mikrosezierung erhält man DNA-Banken aus chromosomalen Teilbereichen oder ganzen Chromosomen, aus denen dann die benötigten Sonden hergestellt werden können. Dies wird am Institut für Humangenetik Jena nach dem Protokoll von Rubstov und Mitarbeitern durchgeführt (Rubtsov et al. 1996).

In Tabelle 3.3 sind die hier verwendeten Mikrosezierungssonden aufgeführt.

Sondenbezeichnung	chromosomale Region	Referenz
wcp 1–12,14,16,17	gesamtes Chromosom	(Senger et al. 1998)
pcp 1p,1q,7p,7q, 16p,16q	gesamter p- bzw. q-Arm des entsprechenden Chromosoms	(Liehr und Claussen 2002)
MCB 1,7,9,11	verschiedene DNA-Banken des entsprechenden Chromosoms	(Liehr et al. 2002) (Weise et al. 2008)

Tabelle 3.3.: verwendete Mikrosezierungssonden

Kommerzielle Sonden

Kommerziell erhältliche Sonden werden gebrauchsfertig geliefert, bezogen über die Firma Abbott (ehemals Vysis).

Eingesetzt wurden Subtelomersonden für die Chromosomenarme 1p, 2q, 7p und 7q und eine Sonde für Zentromer 7.

Sonden-Mixe

Verschiedene Sonden-Mixe wurden am Institut für Humangenetik Jena etabliert und entsprechend der Fragestellung eingesetzt.

Tabelle 3.4 zeigt die genutzten Sondenmixe.

Bezeichnung Sondenmix	Zusammensetzung	Referenz
M-FISH	wcp1-22,X,Y	(Senger et al. 1998)
sc-Mix 11	p- und q-Arm-spezifische Subtelomersonden und Subzentromer-BAC für p- und q-Arm des Chromosoms 11	nicht publizierte Arbeiten und (Starke et al. 2003)

Tabelle 3.4.: verwendete Sondenmixe

3.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, aus dem Englischen: polymerase chain reaction) ermöglicht die nahezu exponentielle Vervielfältigung von geringen DNA-Mengen (Saiki et al. 1985).

Zur Durchführung einer PCR benötigt man eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase aus dem Bacterium *Thermophilus aquaticus*), die eine 5' → 3'-Polymerase enthält, deren Aktivitätsoptimum bei 72°C liegt. Weiterhin werden Puffer, Nukleotide, ein Oligonukleotid-Primer und Ausgangs-DNA (template-DNA) benötigt.

Der Ablauf der PCR besteht aus drei, sich 30 mal wiederholenden Zyklen, die bestimmte Temperaturen erfordern:

MATERIAL UND METHODEN

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. Denaturierung: | Bei 92°–98°C erfolgt die Trennung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge. |
| 2. Anlagerung der Primer (Annealing): | Bei ca. 56°C lagern sich die Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge. |
| 3. DNA-Synthese (Elongation): | Bei 70°–74°C beginnt die Taq-Polymerase ab dem Primer mit der komplementären Ergänzung des DNA-Stranges. |

Man kann sowohl spezifische Primerpaare nutzen, die einen ganz bestimmten Genabschnitt amplifizieren, als auch unspezifische, die einen unbekannten Genabschnitt oder auch das gesamte Genom vervielfältigen.

Die für diese Arbeit durchgeführten PCRs wurden immer unter sterilen Bedingungen an der Werkbank vorbereitet. Auch sämtliche Lösungen für die PCR wurden hier hergestellt und portioniert, um sie Nuklease- und Fremd-DNA-frei zu halten.

Die PCR-Reaktionen wurden in PTC-200 Thermocyclern (Peltier Thermo Cycler von Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt.

DOP-PCR

Bei der DOP-PCR werden degenerierte Oligonukleotid-Primer (DOP-Primer) (Telenius et al. 1992) eingesetzt, die unspezifisch binden und daher zur Vervielfältigung unbekannter DNA-Sequenzen genutzt werden können.

Die eingesetzten Oligonukleotidprimer sind 22 Basenpaare lang und enthalten eine variable Region aus 6 zufällig gewählten Nukleotiden (N), die wiederum von spezifischen Basen flankiert werden (Bohlander et al. 1992). Daraus ergibt sich folgende Primersequenz: 5' CCG ACT GCA GNN NNN NAT GTG 3'. Die hier gewählte niedrige Annealing-Temperatur von 25°C ermöglicht eine Bindung des Primers an vielen Stellen des Genoms.

Die eingesetzte Sequenase ist thermoinstabil und wird nach jedem Denaturierungsschritt temperaturbedingt zerstört und muss daher immer wieder zugegeben werden. Dies gilt allerdings nur für die ersten 3 Zyklen, für die restlichen 31 Zyklen wird einmalig die hitzestabile Taq-Polymerase eingesetzt.

Zu Beginn werden in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß 1,63 µl Lösung A (alle Lösungen siehe Tabelle 3.5, nächste Seite) vorgelegt und 3,37 µl DNA zugegeben. Das DOP-Programm wird gestartet und der erste Denaturierungsschritt läuft ab. Dann werden in den nächsten 3 Zyklen jeweils 0,24 µl von Lösung B zugefügt. Im letzten Schritt werden 45 µl von

MATERIAL UND METHODEN

Lösung C und 5 μl von Lösung D zugegeben. Nun beginnen die Hochtemperaturzyklen (Ablauf siehe Tabelle 3.6, nächste Seite).

Komponenten	Menge pro Sonde
Lösung A	
DNA	3,37 μl
Sequenase Reaction Buffer	0,6 μl
DOP-Primer	0,63 μl
dNTPs	0,4 μl
Lösung B	
Sequenase	1,75 μl
Sequenase Dilution Buffer	0,25 μl
Lösung C	
Aqua ad iniectabilia	34,23 μl
10x Stoffel Puffer	5 μl
dNTPs	4,4 μl
DOP-Primer	1,37 μl
$MgCl_2$	5 μl
Lösung D	
Aqua ad iniectabilia	4,2 μl
10x Stoffel Puffer	0,6 μl
$MgCl_2$	0,6 μl
AmpliTaq DNA-Polymerase	0,6 μl
Stoffel Fragment	

Tabelle 3.5.: Ansatz für DOP-PCR

MATERIAL UND METHODEN

Zyklus	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	92°C	5 min	initiale Denaturierung
2	25°C	2:20 min	Zugabe Lsg. B, Primer-Annealing
3	34°C	2 min	Elongation
4	90°C	1 min	Denaturierung
			Zyklen 2–4 werden zweimal wiederholt
5	30°C	2:20 min	Zugabe Lsg. C, Primer-Annealing
6	92°C	1 min	Denaturierung
7	56°C	2:20 min	Zugabe Lsg. D, Primer-Annealing
8	70°C	2 min	Elongation
9	0,1° pro Sekunde bis 74°C		
10	92°C	1 min	Denaturierung
11	56°C	1 min	Primer-Annealing
12	70°C	2 min	Elongation
13	0,1° pro Sekunde bis 74°C		
			Zyklen 11–13 werden 31x wiederholt
14	72°C	10 min	Elongation
15	4°C		Reaktionsstopp, 4°C bis zum Abbruch

Tabelle 3.6.: Ablauf DOP-PCR

Nach Beenden des DOP-Programmes hält der Cycler eine Temperatur von 4°C. Es werden 1 μ l EDTA zur Stabilisierung der DNA gegenüber Nukleasen zugegeben. Die Proben können weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

Reamplifizieren

Zur weiteren Vervielfältigung und zur Erhöhung der DNA-Konzentration wird eine Reamplifizierungs-PCR durchgeführt. So kann man die DNA aus dieser PCR nutzen und muss nach Aufbrauchen keine aufwendige DOP-PCR durchführen. Hierbei wird eben-

MATERIAL UND METHODEN

falls der in Abschnitt 3.2.2 bereits aufgeführte DOP-Primer eingesetzt. Weiterhin wird ausschließlich Taq-Polymerase genutzt, so dass die 30 Zyklen ohne Unterbrechung durchlaufen können. Tabelle 3.7 zeigt das Reamp-PCR-Schema.

Zyklus	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	92°C	3 min	initiale Denaturierung
2	91°C	1 min	Denaturierung
3	56°C	1 min	Primer-Annealing
4	70°C	2 min	Elongation
Zyklen 2–4 wiederholen sich 29x			
5	72°C	5 min	
6	4°C		Reaktionsstopp, 4°C bis zum Abbruch

Tabelle 3.7.: Reamp-PCR-Schema

Die Lagerung dieser Proben erfolgt ebenfalls bei -20°C.

Markierungs-PCR

In die nun amplifizierte DNA werden in der Markierungs-PCR modifizierte Nukleotide eingebaut. Diese Nukleotide sind entweder direkt mit Fluorochromen gekoppelt oder es sind Haptene (Biotin-16-dUTP, Digoxigenin-11dUTP) gebunden, die später indirekt markiert werden (siehe Abschnitt 3.3.4). Auch bei dieser PCR kommt der bereits in Abschnitt 3.2.2 erwähnte DOP-Primer zum Einsatz. Der eingesetzte Nukleotidmix („Labelmix“) beinhaltet 1mM dTTP und je 2mM dGTP, dCTP und dATP. Durch die geringere Konzentration an dTTP wird dUTP (gekoppelt mit den entsprechenden Fluorochromen bzw. Haptenen) besser eingebaut.

Die Tabellen 3.8 bzw. 3.9 zeigen die zur direkten Markierung verwendeten Fluorochrome bzw. die zur indirekten Markierung eingesetzten Haptene.

Name (Abkürzung)	Hersteller	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Diethylaminocumarin-5-dUTP (DEAC)	NEN Life Science Products, Inc.	426	480

Tabelle 3.8.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

MATERIAL UND METHODEN

Name (Abkürzung)	Hersteller	Absorptions- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)
SpectrumGreen-dUTP (SG)	Abbott	479	524
SpectrumOrange-dUTP (SO)	Abbott	559	588
ChromaTide-TexasRed- 12-dUTP	Molecular Probes	587	612

Tabelle 3.8.: Fluorochrome für die direkte Markierung

Name (Abkürzung)	Hersteller	Absorptions- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)
Avidin-Fluorescein5- iso-Thiocyanat (SA-FITC)	Vector Laboratories	494	518
anti-Digoxigenin- Rhodamine (<i>alpha</i> -Dig- Rho)	Roche	596	615
FluoroLink-Cy5- streptavidin (SA-Cy5)	Amersham	649	670

Tabelle 3.9.: Fluorochrome für die indirekte Markierung

Die Markierungs-PCR benötigt die in Tabelle 3.10 angezeigten Komponenten. Die Zyklusparameter sind die gleichen wie auch schon bei der Reamplifizierungs-PCR angegeben (siehe Tabelle 3.7, Seite 31).

Komponenten	Menge pro Sonde
Aqua ad iniectabilia	12,08 μ l
DOP-Primer	1 μ l
Label-Mix	2 μ l
10x PCR-Puffer	2 μ l
$MgCl_2$	2 μ l
AmpliTaq DNA-Polymerase	0,12

Tabelle 3.10.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

MATERIAL UND METHODEN

Komponenten	Menge pro Sonde
DNA	2 μ l
DEAC,TR,bio,dig	1 μ l
Fl,SG,SO	2 μ l

Tabelle 3.10.: Ansatz für Markierungs-PCR

Die markierte DNA wird nun gefällt (siehe Abschnitt 3.2.4), in Dextransulfat gelöst und kann genutzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.3. Nick-Translation

Eine weitere Möglichkeit, DNA zu markieren, ist die Nick-Translation, die erstmals von Rigby et al. (Rigby et al. 1977) beschrieben wurde. In einen DNA-Doppelstrang werden mit Hilfe des Enzyms DNase I und der nukleolytischen Aktivität der DNA-Polymerase I (Kronberg-Polymerase) DNA-Strangbrüche („Nicks“) gesetzt. Die polymerisierende Aktivität der DNA-Polymerase I repariert mit den zuvor zugegebenen Nukleotiden diese Strangbrüche und baut auf diesem Weg die markierten Nukleotide ein. Diese Reaktion läuft für 90 Minuten bei 15°C. Danach wird 1 μ l EDTA zugegeben und der Ansatz für 10 Minuten bei 60°C belassen, wobei die Reaktion abgestoppt wird. Die Komponenten für die Nick-Translation sind nachfolgend aufgeführt:

Ansatz für direkte Markierung:

- 9 μ l Aqua ad iniectabilia
- 4 μ l Nick-Translations-Mix (Roche), enthält Puffer und Enzyme
- 4 μ l des gewünschten Fluorochroms, enthält dATP,dGTP,dCTP, in geringer Menge dTTP und markiertes dUTP (siehe Tabelle 3.8)
- 3 μ l Ausgangs-DNA (aus reamp-PCR, siehe Abschnitt 3.2.2)

Ansatz für indirekte Markierung:

- 13 μ l Aqua ad iniectabilia
- 4 μ l Biotin-16-dUTP-Nick-Translationskit (Roche), enthält Nukleotide, Enzyme, Puffer
- 3 μ l Ausgangs-DNA (aus Reamp-PCR, siehe Abschnitt 3.2.2)

Die markierte DNA wird nun gefällt (siehe Abschnitt 3.2.4), in Dextransulfat gelöst und kann genutzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.4. DNA-Fällung

Zur Aufreinigung und Höherkonzentrierung der markierten DNA wird eine Alkohol-
präzipitation durchgeführt.

Zu jeder Probe werden 10 μ l tRNA (zur Erhöhung der DNA-Konzentration), 5 μ l 3M Natriumacetat und 90 μ l absoluter Alkohol (*EtOH_{abs}*) zugefügt. Die Proben werden für 20 Minuten bei -80°C oder für mindestens 2 Stunden (bis maximal über Nacht) bei -20°C belassen. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 15.000 U/min. Der Überstand wird verworfen und die Probe für ca. 10 Minuten in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac, Savant) getrocknet. Die Probe wird dann in Dextransulfat gelöst, entsprechend der gewünschten Endkonzentration wird eine bestimmte Menge zugegeben:

- BAC-Sonden: 12 μ l Dextransulfat
- wcp- und pcg-Sonden: 20 μ l Dextransulfat

Zum Lösen werden die Proben für mindestens 30 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler belassen. Danach können sie genutzt oder bei -20°C gelagert werden (Sambrook et al. 1989).

3.3. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die FISH wurde durchgeführt nach (Liehr 2009).

3.3.1. Pepsinbehandlung

Reagenzien für die Pepsinbehandlung

Pepsinstammlösung:

1% 1 N HCl (95 ml Aqua dest. + 5 ml 0,2 N HCl)
0,5% Pepsin-Stocklösung (1 g Pepsin (Sigma) auf 50 ml Aqua dest.)
portionieren zu je 500 μ l und lagern bei -20°C

PBS:

47,75 g PBS Dulbecco
5 l Aqua dest.

Postfixationslösung:

500 μ l Paraformaldehyd (2g Paraformaldehyd-Pulver (Sigma))
100 ml 1x PBS und 10 μ l 1N NaOH bei 70°C 1 h lösen (1%)
450 μ l 1xPBS
50 μ l MgCl₂

MATERIAL UND METHODEN

Um eine erfolgreiche Hybridisierung durchführen zu können, ist ein möglichst plasmafreies Präparat erforderlich. Die Einwirkung proteinverdauender Enzyme (wie z.B. Pepsin) führt dazu, dass das Plasma durchlässiger für die Sonden-DNA und somit weniger störender Hintergrund erzeugt wird. Eine zu lange Einwirkungsdauer des Pepsins kann allerdings zur Zerstörung der Chromosomen oder sogar zu deren Ablösung vom Objektträger führen. Darum wird im Anschluss ein Postfixationsschritt durchgeführt.

Die HCl-Lösung (1%-ig) wird im Wasserbad auf 37°C vorgeheizt, erst dann gibt man 500 µl der Pepsinstammlösung dazu. Sofort werden die Objektträger in die Lösung gestellt und für exakt 5 Minuten so belassen. Es folgt ein Waschschrift in 1xPBS bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Dann wird der Postfixationsschritt durchgeführt, wobei der Objektträger mit 100 µl Postfixationslösung für 10 Minuten überschichtet wird. Daran schließt sich ein zweiter Waschschrift in 1xPBS für 5 Minuten an. Zum Schluss wird der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 Minuten in 70%, 95% und *EtOH_{abs}*) dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

3.3.2. Denaturierung

Reagenzien zur Denaturierung

Dextransulfat:

- 2 g Dextransulfat (Sigma)
- 2 ml 20xSSC (GibcoBRL)
- 2 ml 0,5 M Natriumphosphat (Merck)
- 5 ml deionisiertes Formamid (Sigma)
- auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen und ca. 3 h bei 70°C lösen

70 %iges Formamid:

- 140 ml Formamid (Merck)
- 20 ml 20xSSC (Gibco BRL)
- 40 ml Aqua dest.
- mit 1N HCl auf pH 7,0–7,5 einstellen

Cot-1 DNA (100 µg; Roche)

- 50 µl Cot-1 DNA in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß mit doppeltem Volumen *EtOH_{abs}* versetzen, in der Speed Vac (Savant) eintrocknen und bei -20°C lagern

Dieser Schritt der Doppelstrangtrennung in Einzelstränge ist notwendig, damit die Sonden-DNA an die Ziel-DNA (Untersuchungsmaterial auf dem Objektträger) binden

kann. Daher muss die Denaturierung sowohl auf dem Objektträger als auch an der Sonden-DNA stattfinden.

Denaturierung auf dem Objektträger

Die Denaturierung erfolgt mit Hilfe von Formamid, da es die Stabilität der DNA-Stränge herabsetzt und daher eine niedrigere als die sonst notwendige Denaturierungstemperatur gewählt werden kann, wodurch die Chromosomenstruktur weniger stark beschädigt wird.

Die Objektträger werden auf der Heizplatte bei 72°C mit 100 μ l 70% Formamid überschichtet und für 3–5 Minuten belassen. Es zeigte sich, dass sich einige der Leukämiefälle und auch die Zelllinien erfolgreicher hybridisieren lassen, wenn sie zuvor für 5 Minuten denaturiert wurden. Im Anschluss werden die Objektträger für 3 Minuten in -20°C - kaltem 70% Alkohol belassen, um eine Renaturierung zu verhindern. Daran schließen sich jeweils 3 Minuten in 95% Alkohol und *EtOH_{abs}* und die Lufttrocknung an.

Die Objektträger sollten optimal erst kurz vor der Hybridisierung denaturiert werden, um das Renaturieren zu vermeiden.

Denaturierung der Sonden-DNA

Die Denaturierung erfolgt entsprechend der Sonden in zwei verschiedenen Programmen, die mit Hilfe eines Thermocyclers durchgeführt werden:

Programm PREHYB:

1. 75°C für 5 Minuten: Denaturierung
2. 4°C für 2 Minuten: Abkühlung
3. 37°C für 30 Minuten: Prähybridisierung

Programm DIREKT:

1. 72°C für 5 Minuten: Denaturierung
2. 4°C bis zur Entnahme der Proben aus dem Cycler (verhindert Renaturierung)

Da die Sonden in Dextransulfat gelöst sind, welches unter anderem Formamid enthält, können sie wie auch die Objektträger bei geringerer Temperatur denaturiert werden. Zusätzlich kommt COT-DNA zum Einsatz. Sie enthält hochrepetitive Sequenzen (der Alu- und L1-Familie), die die hochrepetitiven Sequenzen auf der Sonden-DNA abblockt,

MATERIAL UND METHODEN

um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die COT-DNA wurde entsprechend der gewünschten Endmenge mit doppelter Menge $EtOH_{abs}$ versetzt und in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac, Savant) eingetrocknet. Entsprechend der Anzahl und Art der Sonden variiert das Volumen Dextransulfat und COT-DNA, die eingesetzt werden. Bei Zentromersonden wird keine COT-DNA eingesetzt, da sonst die hochrepetitiven Sequenzen der Zentromere abgeblockt werden würden.

Für Leukämiefälle und Zelllinien werden meist 2 wcp-Sonden und 2 bis 3 BAC-Sonden gemeinsam hybridisiert. Der Ansatz für ein Hybridisierungsfeld auf dem halben Objektträger (24x24 mm) ist dann folgender:

- 15 μ g COT-DNA, 3 μ l pro wcp-Sonde, 3,5 μ l bis 4 μ l pro BAC-Sonde
(Denaturierungsprotokoll PREHYB)

Für weitere Sonden auf einem Hybridisierungsfeld von 24x24 mm gilt:

- MCB: 15 μ g COT-DNA, 5 μ l Sonde, 5 μ l DS
(Denaturierungsprotokoll PREHYB)
- M-FISH: 25 μ g COT-DNA, 6 μ l Sondenmix, 4 μ l DS
(Denaturierungsprotokoll PREHYB)
- Zentromersonden, Subtelomersonden: 0,9 μ l Sonde, 8,2 μ l Hybridisierungspuffer (Abott)
(Denaturierungsprotokoll DIREKT)

3.3.3. Hybridisierung

Die nun denaturierten Sonden werden auf den ebenfalls denaturierten Objektträger aufgetragen und mit einem 24x24 mm-Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Um ein Austrocknen zu vermeiden, werden die Ränder mit Fixogum (Marabu) abgedichtet. Die so präparierten Objektträger werden in einer feuchten Kammer im 37°C-Brutschrank inkubiert. Leukämiefälle und Zelllinien zeigen ein hochwertigeres Hybridisierungsergebnis, wenn sie zwei Nächte (ca. 40 Stunden) im Brutschrank belassen werden.

3.3.4. Waschung und Detektion

Reagenzien zur Waschung und Detektion

50%iges Formamid:

250 ml Formamid (Merck)
50 ml 20xSSC (GibcoBRL)
200 ml Aqua dest
mit 1N HCl auf pH 7,0–7,5 einstellen

2xSSC:

50 ml 20x SSC
450 ml Aqua dest.
mit 1N HCl auf pH 7,0–7,5 einstellen

4xSSC/Tw:

100 ml 20xSSC
400 ml Aqua dest.
250 μ l 0,05%-iges Tween 20 (Sigma)
mit 1N HCl auf pH 7,0–7,5 einstellen

4x SSCTM:

0,1 g fettfreie Trockenmilch (Marvel)
2 ml 4xSSCTw
vortexen, bei 1.500 U/min für 5 min zentrifugieren (oberste Schicht entfernen)

Die Waschung erfolgt zur Entfernung unspezifischer Signale und des Hintergrundes. Allerdings müssen die Parameter eingehalten werden, um die erwünschten Signale nicht abzuschwächen oder zu entfernen. Zur Waschung der Leukämiefälle und Zelllinien empfiehlt sich das sogenannte Langwaschen, da dies nicht zu stringent ist.

Zu Beginn wird das Deckglas vorsichtig vom Objektträger entfernt. Die ersten Waschschriffe durchlaufen folgendes Protokoll:

1. 3x 5 Minuten 50% Formamid bei 42°C
2. 3x 5 Minuten 2xSSC bei 42°C
3. ca. 2 Minuten 4xSSC/Tw bei Raumtemperatur (auf Schüttler)

Für indirekt markierte Sonden (siehe Abschnitt 3.9) folgt anschließend das Abblöcken unspezifischer Bindungsstellen der Antikörper, in dem der Objektträger mit 100 μ l

MATERIAL UND METHODEN

4xSSCTM überschichtet und für 15 Minuten im 37°C-Brutschrank belassen wird. Darauf erfolgt erneut ein Waschschrift für ca. 2 bis 3 Minuten in 4xSSC/Tw auf dem Schüttler. Dann wird der Objektträger mit 85 μ l der Antikörperlösung (siehe Tabelle 3.11) überschichtet und erneut im 37°C Brutschrank für ca. 40 Minuten inkubiert.

Antikörper(Ak)	verwendete Menge Antikörper (gelöst in 90 μ l 4x SSC/Tw)
Antidig-Rhodamine	7 μ l (Ak gegen Digoxigenin)
SA-Cy5	4 μ l (Ak gegen Biotin)
SA-Fitc	1 μ l (Ak gegen Biotin)

Tabelle 3.11.: Verwendete Antikörperlösungen. Die Antikörper werden vor dem Auftragen für 3 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert.

Nun folgt ein weiterer Waschschrift für zweimal 5 Minuten in 4xSSC/Tw auf dem Schüttler. An dieser Stelle fährt man auch fort, wenn man direkt markierte Sonden hat, da man die Detektion mit Antikörpern überspringen kann. Die Objektträger werden noch kurz in Aqua dest. auf dem Schüttler gewaschen und Durchlaufen die aufsteigende Alkoholreihe (je 3 Minuten in 70%, 95% und $EtOH_{abs}$) zur Dehydrierung, um anschließend im Dunkeln zu Trocknen.

Zur Darstellung der Chromosomen wird DAPI (4'-6'-Diamidino-2'-Phenylindol, gelöst in Antifade-Vectashild Mounting Medium) eingesetzt. Ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der eine GTG-ähnliche Bänderung (Giemsa-Färbung) erzeugt und so die Unterscheidung der Chromosomen anhand ihrer Bänderung ermöglicht. Für Leukämiefälle und Zelllinien wurden zusätzlich wcp-Sonden eingesetzt, da häufig eine Bänderung nicht mehr zu erkennen ist. Auf einen Objektträger werden ca. 40 μ l DAPI gegeben und dieser wird mit einem 24x60 mm-Deckglas eingedeckt.

3.3.5. Aufnehmen und Auswerten

Der so behandelte Objektträger kann nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Es wurde ein Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) mit speziellem Filterset (DAPI, SG, SO, TR, Cy5, DEAC) und einer angeschlossenen CCD-Videokamera genutzt. Die Bearbeitung und Auswertung der aufgenommen Bilder erfolgte mit Hilfe der ISIS-Software (MetaSystems GmbH, Althusheim) und der Paint Shop Pro 4 - Software.

4. Ergebnisse

4.1. Molekularzytogenetische Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellsuspensionen von insgesamt zwölf Tumorpatienten und sechs Tumorzelllinien molekularzytogenetisch mittels BACs untersucht, um die exakte Lage der Bruchpunkte identifizieren zu können und einen Vergleich mit der Fragile Sites-Lage vorzunehmen. Die Befunderstellung der zytogenetischen Chromosomenveränderungen der untersuchten klinischen Fälle erfolgte im Institut für Humangenetik Jena.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt. Tabelle 4.1 zeigt zusammenfassend die Kartierungsergebnisse der untersuchten klinischen Fälle bzw. Zelllinien.

Kartierungsergebnis	Anzahl untersuchte klin. Fälle/Zelllinien	Anzahl kartierte Tumor-Bruchpunkte
exakt	2	2
angenähert	7	9
ausgeschlossen	7	0

Tabelle 4.1.: Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse

4.1.1. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit exakter BAC-Kartierung

Tabelle 4.2 (siehe nächste Seite) zeigt zusammenfassend die molekularzytogenetische Kartierung und die zytogenetische Karyotypisierung der zwei Bruchpunkte, die mittels zweier Bruchpunkt-flankierender BACs exakt kartiert werden konnten.

ERGEBNISSE

Fall-nummer	zytogenet. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenetische Kartierung Tumorbruchpunkt (bp start-stop/BAC)	Größe in bp
05456	9q13	t(1;9)(p?;q22), neu: 9q13	70.320.668–70.406.895/ RP11-274B18,RP11-639J8	86.227
98211	17q23	t(1;17)(p36.3;q23)	57.418.528–57.650.888/ RP11-342K2,RP11-51L5	232.360

Tabelle 4.2.: Darstellung der molekularzytogenetischen Kartierung der Tumorbruchpunkte und des Karyotyps der untersuchten Fälle, bei denen eine exakte Kartierung möglich war. Des Weiteren Angabe der Größenausdehnung des Bruchpunktes.

Kartierung des Falls 05456

Bei dieser Patientin mit AML lag folgender zytogenetisch bestimmter Karyotyp vor: 47,XX,t(1;9)(p?;q22),+11/46,XX. Im Laufe der Kartierung erwies sich der untersuchte Bruchpunkt, der in 9q22 erwartet wurde, als in 9q13 liegend von 70.320.668 bis 70.406.895 bp mit einer Größenausdehnung von 86.227 bp. Als Bruchpunkt-BACs wurden RP11-274B18 (von 70.320.668 bis 70.488.660 bp) und RP11-639J8 (von 70.406.270 bis 70.406.895 bp) identifiziert. Chromosom 9 wurde mit wcp 9 dargestellt, um es besser aufzufinden. Die Abbildung 4.1 zeigt Chromosom 9 gefärbt in DEAC (hellblau) und die Bruchpunkt-BACs RP11-274B18 mit dig-Antidig-rhodamin (rot) bzw. RP11-639J8 mit bio-SA-FITC (grün) detektiert. Beide BACs hybridisieren sowohl am Chromosom 9 als auch am translozierten Teil des Chromosoms 9.

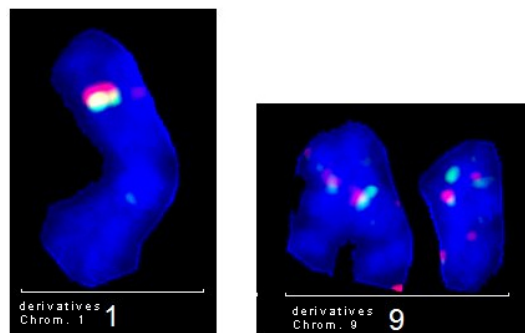


Abbildung 4.1.: Abgebildet sind die beiden Translokationschromosomen 1 und 9 und das intakte Chromosom 9. Die beiden Bruchpunkt-BACs RP11-274B18 (rot) und RP11-639J8 (grün) hybridisieren an beiden Grenzen des Translokationsbruches.

ERGEBNISSE

Die Abbildung 4.2 stellt noch einmal schematisch die Translokation dieses Falles und die Hybridisierungsstellen der Bruchpunkt-BACs dar.

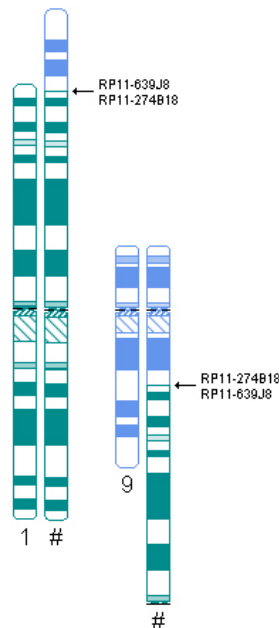


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung der Translokation $t(1;9)(p?;q22)$ (Chromosom 1 türkis, Chromosom 9 blau) des Falles 05456 mit Einzeichnung der Bindungsstellen der Bruchpunkt-BACs (Graphik: www.cydas.org).

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 (siehe Seite 48) zeigen beispielhaft die Annäherung an den Bruchpunkt. In Abbildung 4.3 sieht man den BAC RP11-350E12 (rot, Lage von 87.746.467 bis 87.953.761 bp) am translozierten Teil von Chromosom 9 binden, in Abbildung 4.4 die BACs RP11-21H4 (rot, 69.118.555 bis 69.291.653 bp) und RP11-88I18 (grün, 70.163.371 bis 70.343.347 bp) am Chromosom 9 direkt binden.

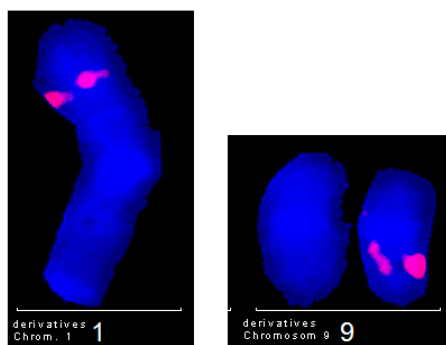


Abbildung 4.3.: Abgebildet sind die beiden Translokationschromosomen 1 und 9 und das intakte Chromosom 9. Der BAC RP11-350E12 (rot) hybridisiert am intakten Chromosom 9 und am translozierten Teil des Chromosoms 9, jedoch nicht am Translokationschromosom 9.

ERGEBNISSE

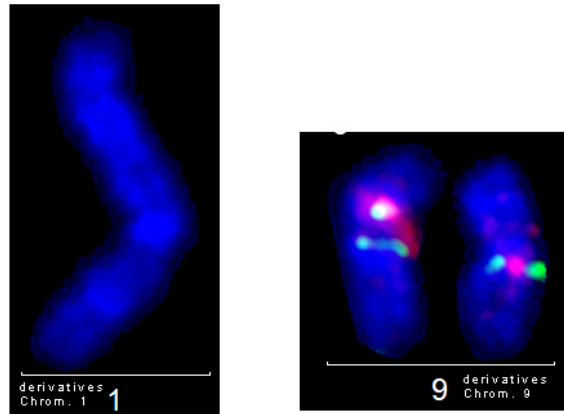


Abbildung 4.4.: Abgebildet sind die beiden Translokationschromosomen 1 und 9 und das intakte Chromosom 9. Die BACs RP11-21H4 (rot) und RP11-88I18 (grün) hybridisieren im Grenzbereich des Translokationsbruches, jedoch nicht im translozierten Teil des Chromosoms 9.

Kartierung des Falls 98211

Der bei diesem Fall nach zytogenetischer Diagnose festgestellte Karyotyp lautet: 46,XY,t(1;17)(p36.3;q23)/46,XY. Beim Patienten lag ein V.a. anaplastische Anämie mit DD MDS vor. Als Bruchpunkt-BACs für den Bruch in 17q23 konnten RP11-342K2 (von 57.418.528 bis 57.473.361 bp) und RP11-51L5 (von 57.650.482 bis 57.650.888 bp) bestimmt werden. Der Bruch erstreckt sich von 57.418.528 bis 57.650.888 bp mit einer Größe von 232.360 bp.

Für den BAC RP11-51L5 (detektiert in dig-Antidig-rhodamin in rot) ist in Abbildung 4.5 dargestellt, wie diese Sonde sowohl an Chromosom 17 als auch im translozierten Teil von Chromosom 17 bindet. Chromosom 17 ist in DEAC (wcp17, hellblau), Chromosom 1 in bio-SA-FITC (wcp1, grün) detektiert.

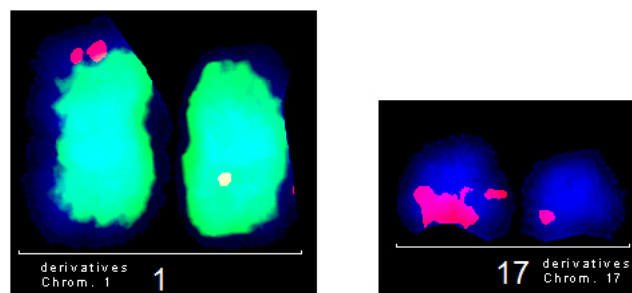


Abbildung 4.5.: Abgebildet sind die beiden Translokationschromosomen 1 (grün) und 17 und jeweils das intakte Chromosom 1 und 17. Der Bruchpunkt-BAC RP11-51L5 (rot) hybridisiert im Grenzbereich des Translokationsbruches, sowohl am Chromosom 17 als auch am translozierten Teil desselben Chromosoms.

ERGEBNISSE

Die Abbildung 4.6 stellt noch einmal schematisch die Translokation dieses Falles und die Hybridisierungsstellen der Bruchpunkt-BACs dar.

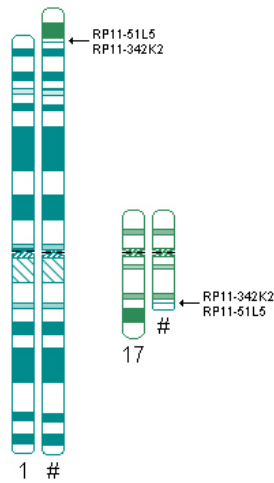


Abbildung 4.6.: Schematische Darstellung der Translokation $t(1;17)(p36.3;q23)$ (Chromosom 1 türkis, Chromosom 17 grün) des Falles 98211 mit Einzeichnung der Bindungsstellen der Bruchpunkt-BACs (Graphik: www.cydas.org).

4.1.2. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit Teilkartierung

In Tabelle 4.3 (siehe nächste Seite) ist die molekularzytogenetische Bruchpunktkartierung der Fälle bzw. Zelllinien, für die nur eine Grenze des Bruchpunktes identifiziert werden konnte, dargestellt. Ebenso angegeben ist die zytogenetische Chromosomenveränderung, die den bereits angegebenen Referenzen entnommen wurde und die entsprechenden Fragile Sites und deren molekularzytogenetische Kartierung.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
1p36	der(1)t(1;14)(p36.3;q11)del(1)(p31p13)t(1;12)(q21.2~q22;q24.1)	~15.630 kbp (proximale Grenze)	Granta-519	FRA1A	12.112–14.890 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, Übereinstimmung
1q21	der(1)t(1;14)(p36.3;q11)del(1)(p31p13)t(1;12)(q21.2~q22;q24.1)	~154.400 kbp (proximale Grenze)	Granta-519	FRA1F	146.154–148.888 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, keine Übereinstimmung
4q22	der(6)t(6;4)(q15;q22)	~98.600 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA4F	89.514–97.532 kbp	(Rozier et al. 2004)	BP liegt distal von FS, Übereinstimmung
4q22	der(6)t(6;4)(q15;q22)	~98.600 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA4F	88.364–94.011 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, fragliche Übereinstimmung

Tabelle 4.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
7p22	der(14)ins(7;14)(p22;q11)	~6.800 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA7B	5.915 kbp	(Ruiz-Herrera et al. 2004)	BP liegt proximal von FS, Übereinstimmung
7p22	der(14)ins(7;14)(p22;q11)	~6.800 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA7B	3.527–5.845 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, Übereinstimmung
7p15	t(1;7)(?;p14)/ t(6;7)(q22;p14), neu:7p15	28.000–32.000 kbp (proximale Grenze)	06088/ 95156	keine FS bekannt	-	-	-
7q22	der(7)t(7;?)(q22;?)	99.700 kbp (proximale Grenze)	COLO320	FRA7F	106.822 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung

Tabelle 4.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
8q24	der(8)i(8)(qter→q10::q10→q24::hsr::q24→qter)	~138.000 kbp (distale Grenze)	HT29	FRA8C	128.120 kbp, 128.490 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, keine Übereinstimmung
9q21	der(6;9)t(6;9;X;9)(6pter→6q10::9q10→9q21::Xp21.1→Xp11.3::9q21→9qter)	~77.500–78.000 kbp (distale Grenze)	HT29	FRA9K	-	(Mrasek 2009)	ist bisher nur zytogenetisch kartiert
9q22	del(9)(q22q32)	~86.000 kbp (distale Grenze)	04336	FRA9D	97.106 kbp	(Ferber et al. 2003)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung
9q22	del(9)(q22q32)	~86.000 kbp (distale Grenze)	04336	FRA9D	87.398–87.753 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung

Tabelle 4.3.: Molekularzytogenetische Kartierungsergebnisse der untersuchten Tumorbruchpunkte im Vergleich zu Fragile Sites der jeweils selben zytogenetischen Bande.

ERGEBNISSE

Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen beispielhaft für den Fall 04336 mit dem Bruchpunkt in 9q22, wo die verschiedenen BACs entsprechend der Bruchpunktlage hybridisieren. Der BAC RP11-350E12 (rot, von 87.746.467 bis 87.953.761 bp) bindet am Chromosom 9 (Abb. 4.7), die BACs RP11-21H4 (rot, von 69.118.555 bis 69.291.653 bp) und RP11-16N10 (grün, von 70.969.027 bis 71.136.721 bp) liegen innerhalb der Deletion und erscheinen auf dem Chromosom 9 mit der Deletion nicht (Abb. 4.8).

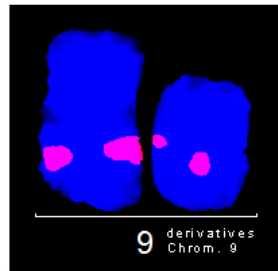


Abbildung 4.7.: Abgebildet sind das intakte und das Chromosom 9 mit Deletion. Der BAC RP11-350E12 (rot) hybridisiert an beiden Chromosomen, da die Deletion proximal davon liegt.

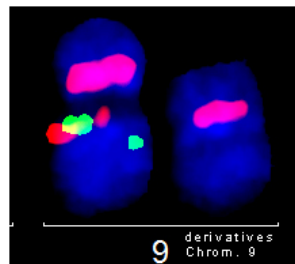


Abbildung 4.8.: Abgebildet sind das intakte und das Chromosom 9 mit Deletion. Die BACs RP11-21H4 (rot) und RP11-16N10 (grün) hybridisieren am deletierten (kleineren) Chromosom 9 nicht, da an dieser Stelle die Deletion lokalisiert ist. Das zweite rote Signal in beiden Chromosomen 9 im p-Arm ist eine Kreuzhybridisierung in 9p11 des BACs RP11-21H4.

4.1.3. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte ohne Kolokalisation mit Fragile Sites

Tabelle 4.4 (siehe nächste Seite) zeigt die Ergebnisse der Tumorbruchpunkte, bei denen gezeigt werden konnte, dass die zytogenetische Kartierung nicht korrekt war.

zytogenet. Chromosomenveränderung	klin. Fall/ Zelllinie	molekularzytogenet. Kartierung Tumor- BP	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS (start-stop)	Referenz	Lage Tumor- BP zu FS
t(5;12)(p14;q12)	NCEB-1	nicht im Bereich 17.465 kbp	FRA5E	17.465 kbp	(Ruiz- Herrera et al. 2004)	keine Überlap- pung, exakte Lage BP aber unklar
inv(16)(p13q22)	07134	nicht zw. 68.500– 72.000 kbp (BP vermutlich proxi- mal davon)	FRA16C	68.592–72.036 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt pro- ximal von FS, keine Überlap- pung
del(9)(q?13q22)	01251	kein BP in 9q22				
t(2;4;12)(q?37;q21;p13)	02150	kein BP in 2q37				
dic(7;14)(p22;p11)	04758	kein BP in 7p22				
t(5;7)(q21;p22)	99249	kein BP in 7p22				
der(7)t(7;17)(q22- 32;q)	MTX140	kein BP in 7q22				

Tabelle 4.4.: Angegeben sind die Tumorbruchpunkte ohne Kolokalisation zu den Fragile Sites derselben zytogenetischen Bande bzw. ohne Kartierung.

4.2. Datenbankanalysen

Anhand der ermittelten Bruchpunktregionen konnten für die Bereiche aus Tabelle 4.2 und 4.3 mit Hilfe verschiedener Datenbanken Gene identifiziert als auch Sequenzanalysen durchgeführt werden.

4.2.1. Gene in den Bruchpunktregionen

Für die zwei exakt kartierten Bruchpunkte (siehe Abschnitt 4.1.1) konnten Gene im Bruchpunktbereich bestimmt werden. Hierzu wurden diverse Internetdatenbanken (NCBI, UCSC, Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology) zu Hilfe genommen. In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Im Anhang (siehe Seite XLVIII) finden sich nähere Erläuterungen zu einzelnen Genen.

zytogen. Lage	Fallnummer	Gen und dessen Lage (bp start-stop)	Bezeichnung/ Erläuterung	neoplasieassoziierte Bedeutung	Referenz
9q13	05456	AK130904, 70.340.626– 70.344.490	hypothetical protein AK130904		
		C9orf71, 70.341.318– 70.345.603	open reading frame 71		
		PGM5, 70.161.635– 70.335.797	phospho- glucomutase 5		
17q23	98211	LOC100129112, 57.438.250– 57.438.889	hypothetical protein LOC100129112		
		MED13, 57.374.748– 57.497.425	mediator com- plex subunit 13	hemmt Transkrip- tion (mit CDK8- Subkomplex)	Knuesel et al., 2009

Tabelle 4.5.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ERGEBNISSE

zytogen. Lage	Fall-nummer	Gen und dessen Lage (bp start-stop)	Bezeichnung/ Erläuterung	neoplasieassoziierte Bedeutung	Referenz
		KIAA0593, 57.442.572– 57.462.156	encodes a component of the mediator complex		
		LOC284167, 57.569.050– 57.586.591	similar to mitochondrial DNA-directed RNA polymerase precursor		
		TBC1D3P2, 57.650.339– 57.654.138	TBC1 domain family, member 3 pseudogene 2		

Tabelle 4.5.: Angegeben sind die im Bruchpunktbereich der exakt kartierten Brüche bestimmten Gene und deren Ausdehnung und Bezeichnung, außerdem nähere Erklärung zum tumorrelevanten Gen.

Auch konnten weitere Gene in der Nähe von Bruchpunktgrenzen in einigen der untersuchten Fälle und Zelllinien bestimmt werden. Diese sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

zytogen. Lage	Fall-nummer/ Zelllinie	Gen und dessen Lage (bp start-stop)	Bezeichnung/ Erläuterung	neoplasieassoziierte Bedeutung	Referenz
1p36.3	Granta-519	FHAD1, 15.442.755– 15.597.360	forkhead-associated (FHA) phospho-peptide binding domain 1		
7p22	LNCaP	ZNF12, 6.694.589– 6.713.091	zinc finger protein 12 isoform b		

Tabelle 4.6.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ERGEBNISSE

zytogen. Lage	Fallnummer/ Zelllinie	Gen und dessen Lage (bp start-stop)	Bezeichnung/ Erläuterung	neoplasieassoziierte Bedeutung	Referenz
		PMS2CL, 6.741.461– 6.757.757	mRNA for PMS2-C terminal-like	PMS2-Gendefekt bewirkt Lynch- Syndrom (PMS2- Gen ist Mismatch- Repair-Gen), PMS2CL ist PMS2-Gen sehr ähnlich	(Etzler et al. 2008, Hayward et al. 2007, Na- kagawa et al. 2004)
7p15	06088/ 95156	LOC401317, 28.222.236– 28.223.616	hypothetical LOC401317		
		CREB5, 28.112.180– 28.632.857	cAMP responsive element binding protein 5		
9q22	04336	FRMD3, 85.052.120– 85.343.168	FERM domain containing 3	Tumorsuppressor- gen in NSCLC	(Haase et al. 2007)

Tabelle 4.6.: Angegeben sind die in den Bruchpunktgrenzen bestimmten Gene und deren Ausdehnung und Bezeichnung, außerdem nähere Erklärung zu tumorrelevanten Genen.

4.2.2. Sequenzanalyse

Ebenso für beide exakt kartierten Bruchpunkte (siehe Abschnitt 4.1.1) wurden Sequenzanalysen mittels der Internetdatenbanken UCSC, RepeatMasker und Database of Genomic Variants durchgeführt. Folgende Tabellen 4.7 und 4.8 zeigen die Ergebnisse der Recherche.

untersuchte Einheit	Länge bzw. Prozentgehalt
Gesamtlänge des Bruches	86228 bp
GC-Gehalt des Bruches	41.59 %

Tabelle 4.7.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ERGEBNISSE

untersuchte Einheit	Länge bzw. Prozentgehalt
Basengehalt des Bruches	45.96 % (39629 bp)
SINEs	12.70 % (10955 bp)
LINEs	19.42 % (16746 bp)
Total interspersed repeats	45.18 % (38957 bp)

Tabelle 4.7.: Sequenzanalyse des Bruchpunktes in 9q13 im Fall 05456. Angegeben sind Länge, GC- und Basengehalt des Bruches und die Menge der Interspersed Repeats.

untersuchte Einheit	Länge bzw. Prozentgehalt
Gesamtlänge des Bruches	232361 bp
GC-Gehalt des Bruches	42.42 %
Basengehalt des Bruches	58.37 % (135633 bp)
SINEs	34.40 % (79928 bp)
LINEs	11.79 % (27396 bp)
Total interspersed repeats	57.03 % (132516 bp)

Tabelle 4.8.: Sequenzanalyse des Bruchpunktes in 17q23 im Fall 98211. Angegeben sind Länge, GC- und Basengehalt des Bruches und die Menge der Interspersed Repeats.

4.2.3. Vergleichende Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte aus Literaturrecherchen mit Fragile Sites

Abschließend wurden Publikationen recherchiert, die mit Hilfe der array-CGH-Methodik (siehe auch Abschnitt 2.2.3) neoplasie-assoziierte Bruchpunkte kartiert haben. Letztere wurden mit der Lage bekannter Fragile Sites verglichen. Es wurden Tumorbruchpunkte in jenen zytogenetischen Banden analysiert, für die bereits eine molekularzytogenetische Kartierung entsprechender Fragile Site vorliegt. Die Übersicht der Ergebnisse findet sich in Tabelle 4.9 (siehe nächste Seite).

zytog. Lage	zytogenet. Chromo- somen- veränderung	molekulargenet. Kartierung Tu- morbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fallnummer	Referenz	FS	molekular- zytogenet. Kartie- rung FS start-stop	Referenz	Lage Tumor- bruch- punkt zu FS
1p36	(1)(p36.22)	12.912–12.937 kbp	Kelly/N206	(Selzer et al. 2005)	FRA1A	12.112– 14.890 kbp	(Mrasek 2009)	innerhalb FS
1p22	der(1)(p22)	100.997–101.176 kbp	PC3	(Watson et al. 2007)	FRA1D	88.092 kbp	(Ruiz- Herrera et al. 2004)	proximal von FS, keine Überein- stimmung
1q31	(1)(q31.3)	193.462.500– 193.637.500 bp	Case 31	(Selzer et al. 2005)	FRA1K	184.235 kbp	(Mrasek 2009)	distal von FS, keine Überein- stimmung

Tabelle 4.9.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytog. Lage	zytogenet. Chromo- somen- veränderung	molekulargenet. Kartierung Tu- morbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fallnummer	Referenz	FS	molekular- zytogenet. Kartie- rung FS start-stop	Referenz	Lage Tumor- bruch- punkt zu FS	ERGEBNISSE
2p13	del(2)(p13)	75.062–75.132 kbp	LNCaP	(Watson et al. 2007)	FRA2E	67.154 kbp	(Mrasek 2009)	proximal von FS, keine Überein- stimmung	
4q21	der(4)(q21)	75.380–75.737 kbp	PC3	(Watson et al. 2007)	FRA4I	84.003– 86.360 kbp	(Mrasek 2009)	proximal von FS, keine Überein- stimmung	
4q31	der(4)(q31)	147.707–148.112 kbp	DU145	(Watson et al. 2007)	FRA4C	144.127– 148.075 kbp	(Mrasek 2009)	über- lappend	
5q35	(5)(q35.1)	173.012.500– 173.137.500 bp	SK-N-AS	(Selzer et al. 2005)	FRA5G	171.047– 171.955 kbp	(Mrasek 2009)	distal von FS, Überein- stimmung	

Tabelle 4.9.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytog. Lage	zytogenet. Chromo- somen- veränderung	molekulargenet. Kartierung Tu- morbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fallnummer	Referenz	FS	molekular- zytogenet. Kartie- rung FS start-stop	Referenz	Lage Tumor- bruch- punkt zu FS
6q15	n.a.	91.702–92.013 kbp	LNCaP	(Watson et al. 2007)	FRA6G	93.297 kbp	(Mrasek 2009)	proximal von FS, Überein- stimmung
6q15	n.a.	87.407–87.595 kbp	LNCaP	(Watson et al. 2007)	FRA6G	93.297 kbp	(Mrasek 2009)	proximal von FS, fragliche Überein- stimmung
7p22	(7)(p22.1)	6.662.500– 6.787.500 bp	SK-N-AS	(Selzer et al. 2005)	FRA7B	5.915 kbp	(Ruiz- Herrera et al. 2004)	proximal von FS, Überein- stimmung
7p22	(7)(p22.1)	6.662.500– 6.787.500 bp	SK-N-AS	(Selzer et al. 2005)	FRA7B	3.527–5.845 kbp	(Mrasek 2009)	proximal von FS, Überein- stimmung

Tabelle 4.9.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytog. Lage	zytogenet. Chromo- somen- veränderung	molekulargenet. Kartierung Tu- morbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fallnummer	Referenz	FS	molekular- zytogenet. Kartie- rung FS start-stop	Referenz	Lage Tumor- bruch- punkt zu FS
7q34	(7)(q34)	143.337.500– 143.462.500 bp	SK-N-AS	(Selzer et al. 2005)	FRA7M	139.131– 144.233 kbp	(Mrasek 2009)	innerhalb FS
8q24	n.a.	128.612.329– 129.784.954 bp, 127.636.646– 131.126.185 bp, 128.612.329– 129.784.954 bp, 128.500.069– 129.547.223 bp	HMB3, HMB12, HMB18, HMB21	(Rossi et al. 2006)	FRA8C	128.120 kbp 128.490 kbp	(Ferber et al. 2003)	über- lappend
10q11.2	(10)(q11.22)	46.337.500– 47.162.500 bp	Case 31	(Selzer et al. 2005)	FRA10G	45.577– 46.174 kbp	(Mrasek 2009)	distal von FS, Überein- stimmung

Tabelle 4.9.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytog. Lage	zytogenet. Chromo- somen- veränderung	molekulargenet. Kartierung Tu- morbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fallnummer	Referenz	FS	molekular- zytogenet. Kartie- rung FS start-stop	Referenz	Lage Tumor- bruch- punkt zu FS
13q21	del(13)(q21.1)	67.214–67.382 kbp	LNCaP	(Watson et al. 2007)	FRA13C	60.475– 64.789 kbp	(Mrasek 2009)	distal von FS, fragliche Überein- stimmung
16q22	(16)(q22.1)	69.412.500– 69.787.500 bp	SK-N-AS	(Selzer et al. 2005)	FRA16C	63.914 kbp	(Zlotorynski et al. 2003)	distal von FS, fragliche Überein- stimmung
16q22	(16)(q22.1)	69.412.500– 69.787.500 bp	SK-N-AS	(Selzer et al. 2005)	FRA16C	68.592– 72.036 kbp	(Mrasek 2009)	innerhalb FS

Tabelle 4.9.: Aufgeführt sind die aus den verschiedenen Referenzen gewonnenen Kartierungen der molekulargenetisch bestimmten Tumorbruchpunkte im Vergleich zur Lage der Fragile Sites.

5. Diskussion

Die Diskussion ist wie folgt gegliedert: Zu Beginn wird das Vorgehen der Bruchpunktkartierung mittels BACs besprochen. Im zweiten Teil erfolgt die Diskussion der vergleichenden Bruchpunktkartierung und in Teil drei die Datenbankanalyse weiterer neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte.

5.1. Bruchpunktkartierung mittels FISH und BACs

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 bzw. 2.2 erläutert, bietet die Bänderungszytogenetik vor allem für die Karyotypisierung von Tumorpatienten nur relativ ungenaue Ergebnisse, da deren Chromosomen meist in minderer Qualität und schlechter Bandenauflösung vorliegen. Daraus ergab sich auch in dieser Arbeit mitunter das Problem, dass bestimmte Bruchpunkte von ausgewählten Fällen nach anfänglicher Kartierung mittels BACs sich als zytogenetisch falsch kartiert erwiesen (d.h. der Bruchpunkt an anderer Stelle als der zuvor kartierten lag). Solche Fälle/ Bruchpunkte waren für die hier vorliegende Arbeit nicht geeignet (siehe Tabelle 4.4).

Bei der Kartierung mittels FISH und BACs beginnt man mit der Hybridisierung von BACs, die in der Bande des Bruchpunktes binden. Im gleichen Hybridisierungsschritt werden auch wcps bzw pcps eingesetzt, um nochmals abzusichern, dass das richtige Chromosom untersucht wird, da wie oben schon erwähnt die Bandenauflösung oft so schlecht ist, dass man daran allein die Chromosomen häufig kaum unterscheiden kann. Nach und nach nähert man sich mit den verschiedenen BACs immer mehr dem Bruchpunkt. Man hat den Bruchpunkt-BAC dann gefunden, wenn dieser gar nicht mehr bindet (da die entsprechende Ziel-DNA wie z.B. bei einer Deletion nicht mehr vorhanden ist) oder, wie z.B. bei einer Translokation, sich auf dem translozierten Teil des Chromosoms findet bzw. sich in seltenen Fällen splittet, da er den Bruchpunkt überspannt.

Um sicher zu gehen, dass die BACs auch tatsächlich in der erwarteten Region des Chromosoms hybridisieren, werden sie vor der Anwendung auf Chromosomen von Tumorpatienten auf gesunden Chromosomen getestet und bewertet (siehe Abschnitt 3.1.1).

Die hier beschriebene Methode der Tumor-Bruchpunktbestimmung mittels BAC-Kartierung hat sich bereits als geeignet für Fragestellungen ähnlich der vorliegenden Arbeit erwiesen (Salaverria et al. 2008, Fabris et al. 2008, Ahmad et al. 2008).

5.2. Vergleichende Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte und Fragile Sites

Im Abschnitt 2.3.1 wurde schon näher darauf eingegangen, dass aufgrund der zytogenetischen Übereinstimmung der Lage von neoplasie-assoziierten Bruchpunkten und Fragile Sites die Vermutung nahe liegt, dass beiden Phänomenen die gleiche Ursache zugrunde liegen könnte und sie auch auf DNA-Ebene möglicherweise im gleichen Bereich lokalisiert sind. Man erhoffte sich, dass sich durch die Identifizierung der exakten Lage von neoplasie-assoziierten Bruchpunkten und Fragile Sites Rückschlüsse auf die Entstehung ebendieser finden lassen könnten (Yunis und Soreng 1984). Zunächst wurde diese Annahme durch statistische Untersuchungen bestätigt (Hecht und Sutherland 1984), doch schon bald konnten weitere Studien einen Gegenbeweis liefern und zeigen, dass Fragile Sites und neoplasie-assoziierte Bruchpunkte bzw. Gene nicht unbedingt im selben Bereich liegen (Simmers et al. 1987, Simmers und Sutherland 1988). Auch bei der Untersuchung von ausschließlich common Fragile Sites im Vergleich zu Tumorbruchpunkten konnte keine einheitliche Lage beider gefunden werden (Sutherland und Simmers 1988).

Im Rahmen einer Promotionsarbeit am Institut für Humangenetik Jena wurde eine Vielzahl von Fragile Sites molekularzytogenetisch kartiert (Mrasek 2009). Darauf aufbauend kann nun ein Vergleich von in vorliegender Arbeit ebenfalls molekularzytogenetisch kartierten neoplasie-assoziierten Bruchpunkten mit diesen Fragile Sites angestellt werden und gleichzeitig geprüft werden, ob im Bereich dieser Tumor-Bruchpunkte für die Tumorentstehung bedeutsame Gene oder Sequenzmotive liegen.

5.2.1. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit exakter Kartierung

Für zwei Bruchpunkte aus Zellsuspensionen von Tumorpatienten gelang eine exakte Bestimmung der Bruchpunktgrenzen. Somit war auch ein Vergleich mit den Fragile Sites der entsprechenden Chromosomenbande, eine Sequenzanalyse und eine Analyse der Gene im Bruchpunktbereich möglich.

Neoplasie-assoziiierter Bruchpunkt in 9q13

Der Fall 05456 einer Patientin mit AML wurde ursprünglich aufgrund der zytogenetischen Kartierung ausgewählt, die eine Translokation mit einem Bruch in der Bande 9q22 angibt ($t(1;9)(p?;q22)$), da für diese Bande eine Fragile Site bekannt ist (FRA9D, (Ferber et al. 2003, Mrasek 2009)). Im Verlauf der Bruchpunktannäherung mittels BACs zeigte sich aber, dass sich der Bruch in 9q13 befindet. Da für diese Bande auch eine Fragile Site bekannt ist (FRA9J, (Mrasek 2009, Borgaonkar 1994)), wurde der Fall weiterbearbeitet. Der Bruchpunkt überstreckt sich im Chromosom 9 von 70.320.668–70.406.895 bp, seine Länge beträgt 86.227 bp. Als Bruchpunkt-BACs konnten RP11-274B18 und RP11-639J8 bestimmt werden (siehe Tabelle 4.2, Seite 45).

Ein Vergleich zur Lage der Fragile Site FRA9J lässt sich noch nicht vornehmen, da diese bisher nur zytogenetisch kartiert wurde. Eine molekularzytogenetische Kartierung steht noch aus.

Im Bruchpunktbereich fanden sich die in Tabelle 4.5 (siehe Seite 59) angegebenen Gene. Es handelt sich um Hypothetical Protein AK130904, Open Reading Frame 71 und Phosphoglucomutase 5. Für die im Bruchpunktbereich identifizierten Gene fand sich in der Literatur für keines eine neoplasie-assoziierte Bedeutung, so dass nach derzeitigem Wissensstand davon ausgegangen werden kann, dass dieser Bruch in die Tumorgenese nicht involviert ist. Jedoch ist es möglich, dass eines dieser Gene in Folge der Translokation als Promotor wirkt und somit eventuell ein Onkogen aktiviert.

Neoplasie-assoziiierter Bruchpunkt in 17q23

Der Fall 98211, ein Patient mit V.a. anaplastische Anämie mit Differentialdiagnose eines MDS, wurde ausgewählt aufgrund eines Translokationsbruches in 17q23 ($t(1;17)(p36.3;q23)$). Es konnten auch hier die Grenzen des Bruchpunktes exakt bestimmt werden. Der Bruch überstreckt sich im Chromosom 17 von 57.418.528–57.650.888 bp und hat eine Länge von 232.360 bp. Als Bruchpunkt-BACs wurden RP11-342K2 und RP11-51L5 festgestellt (siehe Tabelle 4.2, Seite 45).

Die entsprechende Fragile Site der Bande 17q23 FRA17B liegt bei 55.254 kbp (Mrasek 2009). Der Tumorbruchpunkt liegt demnach distal der Fragile Site mit einem Abstand von etwa 2 Mbp. Es besteht also eine räumliche Nähe zwischen Tumorbruchpunkt und Fragile Site und aufgrund der bereits besprochenen Variabilität der Fragile Sites muss von einer Übereinstimmung gesprochen werden.

Die in Tabelle 4.5 (siehe Seite 59) aufgeführten Gene konnten im Bruchpunktbereich

DISKUSSION

identifiziert werden. Von den für diesen Tumorbruchpunkt bestimmten Genen ist im weitesten Sinne von Bedeutung für die Entstehung einer Tumorzelle das MED13-Gen, welches als Genprodukt die Mediator Complex Subunit 13 bildet. Gemeinsam mit CDK8, Cyclin C und Med12 bildet diese den CDK8-Subkomplex und kann so die aktive Transkription überexprimierter aktivierter Gene hemmen. Wie dies genau abläuft ist allerdings noch unklar (Knuesel et al. 2009). Die in diesem Bruchpunkt identifizierten Gene, nach heutigem Wissensstand ohne Bedeutung für die Tumorgenese, sind Hypothetical Protein LOC100129112, KIAA0593, LOC284167 und TBC1D3P2, wobei auch hier eine Translokations-bedingte Verschiebung als Promotor eines Onkogens nicht ausgeschlossen werden kann.

Sequenzanalyse der Tumorbruchpunkte 9q13 und 17q23

Die Sequenzanalysen der zuvor besprochenen Tumorbruchpunkte in 9q13 und 17q23 sind in Tabelle 5.1 angegeben und werden nachfolgend besprochen.

	Bruchpunkt in 9q13 (05456)	Bruchpunkt in 17q23 (98211)	durchschnittl. GC- Gehalt
GC-Gehalt	41.59 %	42.42 %	~41% (International Hu- man Sequencing Consortium 2001)

Tabelle 5.1.: Angegeben ist der GC-Gehalt der sequenzierten Bruchpunkte und der Vergleichswert des durchschnittlichen GC-Gehalts.

Das GC-Level trifft eine Aussage über den Guanin-Cytosin-Gehalt und damit indirekt über den Adenosin-Thymidin-Gehalt einer Sequenz, also über die Menge der Nukleinsbasen Guanin, Cytosin, Adenosin und Thymidin im untersuchten DNA-Abschnitt. Es ist bekannt, dass in Bereichen mit hohem AT-Gehalt gehäuft Instabilitäten und Brüche auftreten, so wie dies häufig bei Fragile Sites der Fall ist (Arlt et al. 2002, Ried et al. 2000, Hormozian et al. 2007). Beide hier aufgeführten Bruchpunkte weisen einen normalen GC-Gehalt von 41,59% bzw. 42,42% auf. Der durchschnittliche GC-Gehalt des menschlichen Genoms beträgt etwa 41% mit einer Spannweite von 36% bis 47% (International Human Sequencing Consortium 2001). Die sequenzierten Bruchpunkte verfügen somit auch über einen normalen AT-Gehalt innerhalb der Bruchpunktsequenz. Demnach kann hierin keine Ursache für die Chromosomenbrüche gesehen werden.

Die Repeat-Analyse der Sequenzen im Bruchpunktbereich ergab keine für die Tumor-

genese relevanten Resultate. Im Anhang finden sich die vollständigen Sequenzanalysen beider Bruchpunkte in den Tabellen A.4 (siehe Seite XLV) bzw. A.5 (siehe Seite XLVII).

5.2.2. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte mit Teilkartierung

Für einen Großteil der bearbeiteten Fälle bzw. Zelllinien ließ sich nur eine Grenze des Bruchpunktes feststellen. Dies ist durch verschiedene Umstände zu begründen: Die zur Kartierung der Bruchpunkte genutzten Chromosomen konnten jeweils nur drei bis viermal hybridisiert werden, da bei noch häufigerer Hybridisierung die Qualität der Chromosomen keine Auswertung mehr zuließ. Es mussten dann neue Objektträger mit Zellsuspension der Patienten betropft werden. Die Zellsuspensionen wurden allmählich entleert, so dass keine weiteren Hybridisierungen mehr vorgenommen werden konnten. Weiterhin lagen einige der chromosomalen Rearrangements in Mosaiken vor, so dass nur mit großem Aufwand die gesuchten Brüche zu finden waren. Die Zelllinien betreffend bestand mehrfach eine so schlechte Qualität der Chromosomen, dass eine genauere Eingrenzung mit FISH nicht möglich war.

In Tabelle 4.3 (siehe Seite 54) ist der Lagevergleich der neoplasie-assoziierten Bruchpunkte mit den entsprechenden Fragile Sites der gleichen zyto-genetischen Bande aufgeführt.

Für den Bruchpunkt in 7p15 ist keine Fragile Site dieser Bande bekannt und daher auch kein Vergleich möglich. Dieser Bruchpunkt wurde in beiden Fällen zunächst kartiert, da der zyto-genetisch festgestellte Karyotyp den gesuchten Bruch für beide Fälle in 7p14 angab, im Rahmen der FISH-Kartierung ergab sich aber ebenso für beide Fälle, dass der Bruchpunkt in 7p15 liegt.

Für den Bruchpunkt der Bande 9q21 ist die Fragile Site FRA9K bekannt (Mrasek 2009), es kann aber kein Vergleich vorgenommen werden, da FRA9K bisher nur zyto-genetisch kartiert wurde.

Für vier der zehn Bruchpunkte lässt sich eine Übereinstimmung von neoplasie-assoziierten Bruchpunkten mit Fragile Sites feststellen. Es sind die Bruchpunkte der Banden 1p36, 4q22 und 7p22 (Der Tumorbruchpunkt in 7p22 wurde mit zwei Fragile Sites-Kartierungen verglichen.). Aufgrund der in der Einleitung bereits erwähnten Variabilität der Lage der Fragile Sites kann bis zu einem Abstand von 2 Mbp zwischen Fragile Site und Tumorbruchpunkt noch von einer Übereinstimmung gesprochen werden (Pedersen und Jensen 1991, Callahan et al. 2003, Mrasek 2009).

Bei zwei der zehn Tumorbruchpunkte, die zum Vergleich mit einer molekularzyto-genetisch kartierten Fragile Site herangezogen werden können, gibt es unzweifelhaft keine

DISKUSSION

Überlappung mit der entsprechenden Fragile Site. Dies betrifft die Bruchpunkte in den Banden 1q21 und 9q22.

Drei dieser zehn neoplasie-assoziierten Bruchpunkte, gemeint sind die Bruchpunkte der Banden 7q22, 8q24 und 9q22 (9q22 im Vergleich mit dem Kartierungsergebnis von (Ferber et al. 2003)), weisen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Übereinstimmung mit den entsprechenden Fragile Sites auf. In diesen Fällen konnte die Grenze, in deren Richtung die Fragile Site liegt, nicht bestimmt werden. Allerdings ist der Abstand zur Fragile Site zu groß (zwischen 7 und 11 Mbp Abstand) um anzunehmen, dass der Tumorbruchpunkt bis dorthin weiterreicht. Die Abbildung 5.1 verdeutlicht diesen Sachverhalt schematisch am Beispiel des Bruches in 7q22.

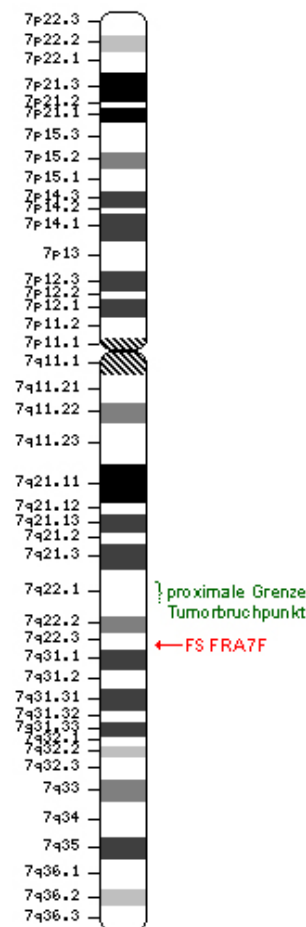


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung des Chromosoms 7. In rot die Lage der Fragile Site FRA7F, in grün die proximale Grenze des Tumorbruchpunktes in 7q22 in deutlicher Entfernung zur Fragile Site (Graphik: NCBI).

Für einen weiteren Tumorbruchpunkt konnte nur fraglich geäußert werden, ob eine Übereinstimmung zur entsprechenden Fragile Site vorliegt. Dies betrifft den Bruchpunkt in 4q22. Bei diesem Bruchpunkt konnte wie schon zuvor, die Grenze, die zur Fragile Site weist, nicht bestimmt werden. Doch im Unterschied dazu ist der Abstand

DISKUSSION

geringer (ca. 4 Mbp), so dass unklar bleibt, ob dieser neoplasie-assoziierte Bruchpunkt möglicherweise bis zur Fragile Site reicht und mit ihr überlappend liegt.

Zum Bruchpunkt in der Bande 4q22, für den zwei vergleichende Lagen angegeben sind, muss erwähnt werden, dass zur entsprechenden Fragile Site FRA4F zwei unterschiedliche molekularzytogenetische Kartierungen zu finden sind (Roquier et al. 2004, Mrasek 2009), so dass dadurch im Vergleich zum Tumorbruchpunkt zwei Ergebnisse resultieren.

Für den Bruch in 9q22 sind ebenfalls zwei Kartierungen für die Fragile Site FRA9D in dieser Bande dargestellt (Ferber et al. 2003, Mrasek 2009), es ergibt sich jedoch im Vergleich von Tumor-Bruchpunkt und Fragile Site nur ein Resultat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar nicht zu allen der untersuchten Tumorbruchpunkte eine Aussage zur vergleichenden Kartierung mit Fragile Sites getroffen werden kann, aber dass man bei vier der zehn Bruchpunkte von einer molekularzytogenetischen Übereinstimmung und bei einem der zehn Bruchpunkte von einer fraglichen Übereinstimmung zu den Fragile Sites ausgehen kann. Bei fünf Bruchpunkten liegt keine Übereinstimmung vor.

Für einige der in diesem Abschnitt besprochenen Tumorbruchpunkte konnten Gene, die nahe der kartierten Grenze liegen, identifiziert werden (siehe Tabelle 4.6, Seite 61).

Zwei dieser Gene könnten im weitesten Sinne für die Tumorgenese von Bedeutung sein. Das PMS2CL-Gen, welches sich im Tumorbruchpunkt der Bande 7p22 der Zelllinie LNCaP findet, ist ein Pseudogen und ähnelt dem PMS2-Gen zu 98%, welches wiederum, ist es defekt, HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) verursachen kann, da es für den Mismatch-Repair zuständig ist. Allerdings wurde bisher kein Protein zum PMS2CL-Gen gefunden und man nimmt an, dass ein Fehlen dieses Pseudogens auch keine Tumorerkrankung auslöst (Nakagawa et al. 2004, Hayward et al. 2007, Etzler et al. 2008), obwohl man dies aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Mismatch-Repair-Gen nicht endgültig ausschließen sollte, da eventuell doch ein Proteinprodukt gefunden werden könnte. Für diesen Fall ist es allerdings auszuschließen, da die untersuchte Zelllinie aus Material eines Patienten mit metastasiertem Prostata-Karzinom hergestellt wurde und somit nicht die Kriterien des HNPCC-Syndroms erfüllt.

Im Tumorbruchpunkt 9q22 des Falles 04336 (eines Patienten mit V.a. MDS) liegt das FRMD3-Gen, welches für den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC, Non-Small-Cell-Lungcancer) als Tumorsuppressorgen agiert. Man findet dieses Gen in Lungenkrebszellen von Patienten mit NSCLC herunterreguliert oder defekt vor (Haase et al. 2007). Beim untersuchten Fall liegt weder diese Tumorart vor, noch wurden Lungenepithelzellen untersucht. Da es sich aber hier möglicherweise um ein Tumorsuppressorgen handelt, kann

für diesen Fall eine Bedeutung in der Tumorprogression nicht ausgeschlossen werden.

5.2.3. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte ohne Kolokalisation mit Fragile Sites

Die hier zu besprechenden Tumorbruchpunkte konnten aus denselben Gründen wie unter Abschnitt 5.2.2 genannt nur annäherungsweise kartiert werden. Ein Vergleich mit den entsprechenden Fragile Sites ist aber dennoch möglich (siehe Tabelle 4.4, Seite 57).

Der Tumorbruchpunkt in 5p14 der Zelllinie NCEB-1 konnte zwar nicht genau eingegrenzt werden, doch im Vergleich zur Fragile Site FRA5E, die bei 17.465 kbp liegt (Ruiz-Herrera et al. 2004), kann anhand der durchgeführten Hybridisierungen auf dieser Zelllinie angenommen werden, dass der Tumorbruchpunkt nicht im Bereich der Fragile Site liegt.

Für den neoplasie-assoziierten Bruchpunkt in 16q22 des Falles 07134 gilt ähnliches. Aufgrund der angestellten Untersuchungen an diesem Fall kann im Vergleich der Lage des Tumorbruchpunktes proximal von 68.500 kbp zur Lage der Fragile Site FRA16C von 68.592 bis 72.036 kbp (Mrasek 2009) ausgeschlossen werden, dass Tumorbruchpunkt und Fragile Site überlappen.

Die übrigen in Tabelle 4.4 aufgeführten Fälle konnten nicht kartiert werden oder wurden nicht kartiert. Es zeigte sich im Rahmen der anfänglichen BAC-Kartierung, dass die vorherige zytogenetische Karyotypisierung fehlerhaft war und sich die erforderlichen Bruchpunkte in anderen zytogenetischen Banden fanden. Zu begründen sind Fehler in der Karyotypisierung in der für Tumorzellchromosomen üblichen außerordentlich schlechten Qualität und geringen Bandenauflösung, wodurch auch geübte Zytogenetiker die ausschließlich mit Hilfe der GTG-Bänderung arbeiten, an ihre Grenzen stoßen.

5.2.4. Zusammenfassender Vergleich der Lage der neoplasie-assoziierten Bruchpunkte und der Fragile Sites

In diesem Abschnitt wird in Übersicht die Lage der in der vorliegenden Arbeit kartierten und zuvor besprochenen neoplasie-assoziierten Bruchpunkte (sowohl der exakt kartierten als auch der Bruchpunkte mit Teilkartierung) und der entsprechenden molekularzytogenetisch kartierten Fragile Sites nebeneinander gestellt. Tabelle A.1 (siehe Seite XXIV) gibt den Überblick. Im Diagramm 5.2 ist noch einmal veranschaulicht, dass fünf der elf

DISKUSSION

neoplasie-assoziierten Bruchpunkte mit Fragile Sites kolokalisieren (Abstand von Bruchpunkt zu Fragile Site bis zu 2 Mbp) und ein Bruchpunkt eine fragliche Übereinstimmung zeigt, dieser liegt in einem Abstand von etwa 4 Mbp zur Fragile Site. Fünf weitere Bruchpunkte weisen keine Übereinstimmung mit Fragile Sites auf, ihr Abstand beträgt mehr als 6 Mbp.

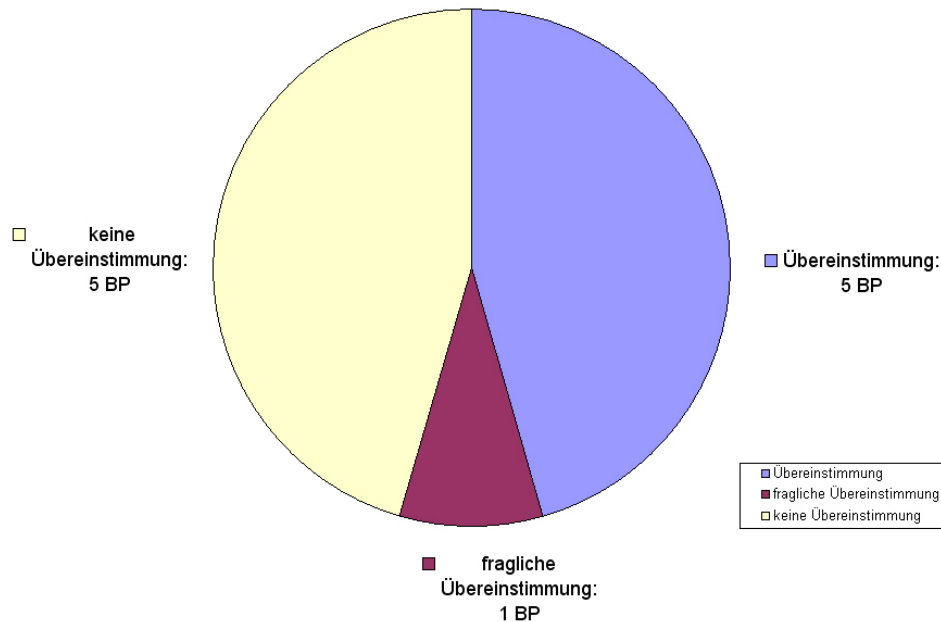


Abbildung 5.2.: Zusammenfassende Darstellung der Vergleichsergebnisse zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites.

Es lässt sich zusammenfassen, dass etwa 50 % der in dieser Arbeit untersuchten neoplasie-assoziierten Bruchpunkte eine Übereinstimmung mit Fragile Sites aufweisen.

Die Untersuchung der Sequenzen und der im Bruchpunktbereich liegenden Gene erbrachte keine für die Tumorgenese dieser Fälle nach heutigem Wissensstand bedeutenden Resultate. Allerdings muss angemerkt werden, dass sich dies nur auf die hier untersuchten Einzelfälle bezieht und keine statistische Aussage möglich ist. Neoplasie-assoziierte Bruchpunkte müssten in deutlich größerem Umfang molekularzytogenetisch oder molekulargenetisch kartiert werden, um einen statistischen Vergleich mit molekularzytogenetisch kartierten Fragile Sites anstellen zu können. Diesem Vorhaben steht jedoch der enorme zeitliche Aufwand einer Durchführung entgegen.

5.3. Vergleichende Kartierung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte aus Literaturrecherchen mit Fragile Sites

Bei dem hier durchgeführten literaturbasierenden Vergleich neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte mit Fragile Sites, dargestellt in Tabelle 4.9 (siehe Seite 72), ist erkennbar, dass zehn der 17 gegenübergestellten Bruchpunkte eine Übereinstimmung aufweisen. Fünf dieser 17 Brüche finden sich entweder innerhalb der entsprechenden Fragile Site (Bruchpunkte in 1p36/FRA1A, 7q34/FRA7M und 16q22/FRA16C) oder sie liegen überlappend mit der entsprechenden Fragile Site (Bruchpunkte in 4q31/FRA4C und 8q24/FRA8C). Die fünf übrigen Bruchpunkte (5q35/FRA5G, 6q15/FRA6G, 7p22/FRA7B in zwei Vergleichen und 10q11/FRA10G) liegen in einem Abstand geringer als 2 Mbp Entfernung zur Fragile Site und können aufgrund der bereits angesprochenen variablen Lage dieser als Übereinstimmung betrachtet werden.

Für drei der 17 aufgeführten Bruchpunkte (6q15/FRA6G, 13q21/FRA13C und 16q22/FRA16C) lässt sich eine fragliche Übereinstimmung aufgrund des Abstandes zwischen 2 bis 6 Mbp zur Fragile Site feststellen.

Betrachtet man die Lage neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte zur entsprechenden Fragile Site, lässt sich keine Regelmäßigkeit erkennen, die neoplasie-assoziierten Bruchpunkte liegen gleichermaßen proximal als auch distal der Fragile Sites.

Die Bruchpunkte der Bande 6q15 und 16q22 zeigen, dass, je nachdem welche Referenz zur Angabe der exakten Kartierung der entsprechenden Fragile Site zu Rate gezogen wird, der Tumorbruchpunkt entweder in Übereinstimmung oder auch in fraglicher Übereinstimmung zur Fragile Site liegt (Zlotorynski et al. 2003, Watson et al. 2007, Mrasek 2009).

Keine Übereinstimmung zu den Fragile Sites zeigen vier der 17 Bruchpunkte (1p22/FRA1D, 1q31/FRA1K, 2p13/FRA2E und 4q21/FRA4I), die Entfernung beträgt über 6 Mbp.

Mittels der hier verglichenen Literaturangaben lässt sich zeigen, dass eine etwa 50%ige Übereinstimmung neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte mit Fragile Sites besteht.

5.4. Abstandsvergleich zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites

Für in dieser Arbeit kartierte Tumorbruchpunkte als auch für Tumorbruchpunkte aus Literaturrecherchen (siehe Abschnitt 5.3) wurde ein Abstandsvergleich durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.2 (siehe Seite XXVI) aufgeführt.

Das Diagramm 5.3 zeigt die Häufigkeiten der in verschiedene Gruppen eingeteilten Abstände.

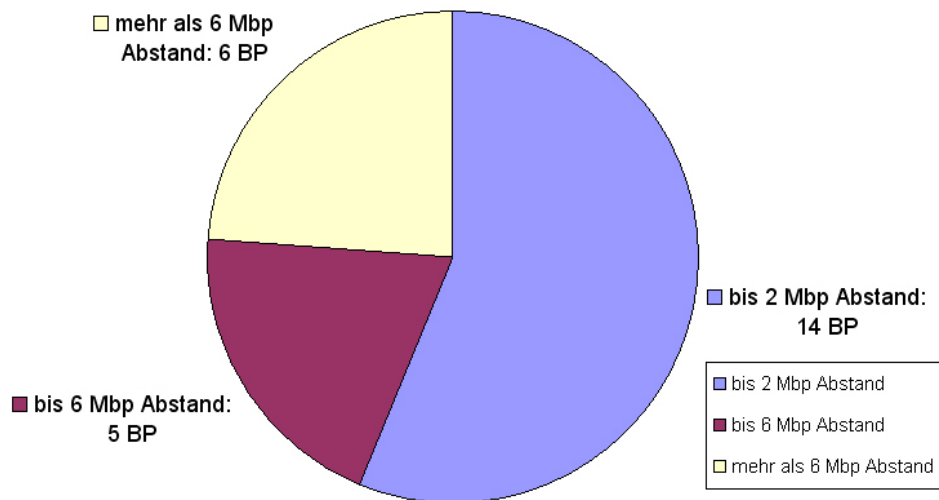


Abbildung 5.3.: Zusammenfassende Darstellung der Abstände zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites ohne Kolokalisation.

So liegen die Abstände zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites überwiegend zwischen 0 und 2 Mbp (bei 14 von 25 Bruchpunkten), fünf von 25 Bruchpunkten liegen bis 6 Mbp von der Fragile Site entfernt und sechs der 25 Bruchpunkte weisen einen Abstand von über 6 Mbp auf. Wie bereits in der Einleitung erläutert, zeigt sich eine gewisse Variabilität bei der Lokalisation der Fragile Sites innerhalb einer zytogenetischen Bande, so dass man bei einem Abstand von bis zu 2 Mbp noch von einer Übereinstimmung von Fragile Sites und Tumorbruchpunkten sprechen kann (Pedersen und Jensen 1991, Callahan et al. 2003, Mrasek 2009). Knapp die Hälfte der neoplasie-assoziierten Bruchpunkte weisen demnach eine Übereinstimmung mit Fragile Sites auf.

6. Ausblick

Die in dieser Arbeit molekularzytogenetisch kartierten Fälle und Zelllinien zeigten in etwa 50 % eine Übereinstimmung der Lage neoplasie-assoziiierter Bruchpunkte und Fragile Sites. Fünf der elf Tumorbruchpunkte wiesen eine Übereinstimmung mit Fragile Sites auf, ein weiterer Bruchpunkt zeigte eine fragliche Übereinstimmung. In der Literaturrecherche fanden sich zehn von 17 Tumorbruchpunkten, die innerhalb oder überlappend mit Fragile Sites lagen. Es fanden sich keine Gene und/oder Sequenzmotive in den Bruchpunktbereichen der Tumorzellchromosomen, die als ursächlich für oder involviert in die maligne Karyotyptransformation der untersuchten Fälle und Zelllinien angesehen werden können.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die gefundene Übereinstimmung von neoplasie-assoziierten Bruchpunkten und Fragile Sites auf DNA-Ebene nicht so stark ausgeprägt ist wie die von Fragile Sites und evolutionär konservierten Bruchpunkten (ca. 75% Übereinstimmung), diesen beiden Phänomenen liegt offensichtlich ein gemeinsamer Ursprung zugrunde (Mrasek 2009). Die Vermutung liegt nahe, dass Fragile Sites keine ursächliche Rolle in der Bruchpunktentstehung im Rahmen der Tumorgenese spielen.

Um eine Aussage zu typischen Sequenzmotiven innerhalb von Tumorbruchpunkten treffen zu können, müssen noch eine Vielzahl von Bruchpunkten in Tumorzellchromosomen auf DNA-Ebene kartiert werden. So könnte man statistisch gesichert bestimmte Sequenzmotive in den Bruchpunktregionen suchen und darstellen, die auf chromosomale Instabilitäten hinweisen und ursächlich für Chromosomenbrüche sind. Auf diese Weise lässt sich eventuell die Entstehung der tumorrelevanten Bruchpunkte aufklären.

Denn die Identifizierung von Bruchpunktregionen ist vermutlich der Schlüssel zum Pathogenesemechanismus der Tumorentstehung und damit auch ein Schritt in Richtung neuer Prognosemethoden und Therapieansätze in der Tumorbehandlung.

Literaturverzeichnis

- Ahmad F, Kokate P, Chheda P, Dalvi R, Das B, Mandava S. 2008. Molecular cytogenetic findings in a three-way novel variant of t(1;8;21)(p35;q22;q22): a unique relocation of the AML1/ETO fusion gene 1p35 in AML-M2. *Cancer Genet Cytogenet*, 180:153–7.
- Arlt M, Miller D, Beer D, Glover T. 2002. Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 33:82–92.
- Arnold J. 1879. Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Virchows Arch Path Anat*, 77:181–206.
- Arrighi F, Hsu T. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10:81–86.
- Bayreuther K. 1952. Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. *Naturforsch*, 76:554–557.
- Bednarek A, Keck-Waggoner C, Daniel R, Laffin K, Bergsagel P, Kiguchi K, Brenner A, Aldaz C. 2001. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res*, 61:8068–73.
- Bohlander S, 3rd RE, Beau ML, Rowley J, Diaz M. 1992. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics*, 13:1322–1324.
- Borgaonkar D. 1994. Chromosomal variation in Man, 7th Edition.
- Boveri T. 1903. Über die Konstitution der chromatischen Kernsubstanz. In: *Verhandlungen der deutschen Zoologischen Gesellschaft, 13. Jahresversammlung zu Würzburg*. Leipzig: Wilhelm Engelmann, S. 10–33.
- Byrnes J. 1984. Structural and functional properties of DNA polymerase delta from rabbit bone marrow. *Mol Cell Biochem*, 62:13–24.

LITERATURVERZEICHNIS

- Callahan G, Denison S, Phillips L, Shridhar V, Smith D. 2003. Characterization of the common fragile site FRA9E and its potential role in ovarian cancer. *Oncogene*, 22:590–601.
- Casper A, Nghiem P, Arlt F, Glover T. 2002. ATR regulates fragile site stability. *Cell*, 111:779–89.
- Caspersson T, Farber S, Foley G, Kudynowski J, Modest E, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res*, 49:219–222.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. 1970. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*, 60:315–319.
- Cheng C, Kuchta R. 1993. DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry*, 32:8568–74.
- Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. 1999. High resolution multicolorbanding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 84:156–160.
- Claussen U, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt U, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T. 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for a concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res*, 98:136–146.
- Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. 1997. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*, 89:215–25.
- Croce C, Nowell P. 1985. Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood*, 65:1–7.
- DeBraekeleer M. 1987. Fragile sites and chromosomal structural rearrangements in human leukemia and cancer. *Anticancer Res*, 7:417–22.
- DeBraekeleer M, Smith B, Lin C. 1985. Fragile sites and structural rearrangements in cancer. *Hum Genet*, 69:112–116.
- Dekaban A. 1965. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. *J Nucl Med*, 6:740–6.

LITERATURVERZEICHNIS

- Denison S, Callahan G, Becker N, Phillips L, Smith D. 2003. Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 38:40–52.
- Dutrillaux B, Lejeune J. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci*, 272:2638–2640.
- Edwards J, Harnden D, Cameron A, Crosse V, Wolff O. 1960. A new trisomic syndrome. *Lancet*, 1:787–790.
- Edwards Y, Putt W, Fox M, Ives J. 1995. A novel human phosphoglucomutase (PGM5) maps to the centromeric region of chromosome 9. *Genomics*, 30:350–3.
- Etzler J, Peyrl A, Zatkova A, Schildhaus H, Ficek A, Merkelbach-Bruse S, Kratz C, Attarbaschi A, Hainfellner J, Yao S, Messiaen L, Slavc I, Wimmer K. 2008. RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. *Hum Mutat*, 29(2):299–305.
- Fabris S, Mosca L, Todoerti K, Cutrona G, Lionetti M, Intini D, Matis S, Colombo M, Agnelli L, Gentile M, Spriano M, Callea V, Festini G, Molica S, Deliliers GL, Morabito F, Ferrarini M, Neri A. 2008. Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 47:781–93.
- Ferber M, Thorland E, Brink A, Rapp A, Phillips L, McGovern R, Gostout B, Cheung T, Chung T, Fu W, Smith D. 2003. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene*, 22:7233–7242.
- Fleischman E, Reshmi S, Sokova O, Kirichenko O, Konstantinova L, Kulagina O, Frenkel M, Rowley J. 1999. Increased karyotype precision using fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping in patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*, 15:166–170.
- Flemming W. 1880. Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. *Arch mikr Ana*, 18:151–259.
- Ford C, Miller O, Polani P, de Almeida J, Briggs J. 1959. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis Turner Syndrome. *Lancet*, 1:711.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gerhard D, Kawasaki E, Bancroft F, Szabo P. 1981. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78:3755–9.
- Glover T, Berger C, Coyle J, Echo B. 1984. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet*, 67:136–42.
- Glover T, Stein C. 1987. Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. *Am J Hum Genet*, 41:882–90.
- Glover T, Stein C. 1988. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am J Hum Genet*, 43:265–73.
- Gümüs G, Sunguroglu A, Tükün A, Sayin D, Bökesoy I. 2002. Common fragile sites associated with the breakpoints of chromosomal aberrations in hematologic neoplasms. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 133:168–171.
- Haase D, Meister M, Muley T, Hess J, Teurich S, Schnabel P, Hartenstein B, Angel P. 2007. FRMD3, a novel putative tumour suppressor in NSCLC. *Oncogene*, 26:4464–4468.
- Hanahan D, Weinberg R. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100:57–70.
- Harper M, Saunders G. 1981. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 83:431–9.
- Hayward B, Vos MD, Valleley E, Charlton R, Taylor G, Sheridan E, Bonthron D. 2007. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. *Hum Mutat*, 28:424–30.
- Hecht F, Sutherland G. 1984. Fragile Sites and Cancer Breakpoints. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 12:179–181.
- Hilgenfeld E, Padilla-Nash H, Schrock E, Ried T. 1999. Analysis of B-cell neoplasias by spectral karyotyping (SKY). *Curr Top Microbiol Immunol*, 246:169–174.
- Hopman A, Wiegant J, Raap A, Landegent J, van der Ploeg M, van Duijn P. 1986. Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemistry*, 85:1–4.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hormozian F, Schmitt J, Sagulenko E, Schwab M, Savelyeva L. 2007. FRA1E common fragile site breaks map within a 370kilobase pair region and disrupt the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). *Cancer Lett*, 246:82–91.
- Hsu T. 1952. Mammalian chromosomes in vitro-The karyotype of man. *J Hered*, 43:167–172.
- International Human Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genom. *Nature*, 409:860–921.
- Jacobs P, Strong J. 1959. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature*, 183:302–303.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258:818–821.
- Knuesel M, Meyer K, Bernecky C, Taatjes D. 2009. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes Dev*, 23:439–451.
- Krummel K, Roberts L, Kawakami M, Glover T, Smith D. 2000. The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations. *Genomics*, 69:37–46.
- Kuechler A, Weise A, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel B, Claussen U, Liehr T. 2003. Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. *Genes Chromosomes Cancer*, 36(2):207–10.
- LeBeau M. 1986. Chromosomal fragile sites and cancer-specific rearrangements. *Blood*, 67:849–858.
- Lejeune J. 1959. Le Mongolisme: Premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet Se Hop*, 1:41–49.
- Lejeune J, Fourcade JL, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. 1963. Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5. *CRAcadSci*, 257:3098–3102.

LITERATURVERZEICHNIS

- Liehr T, Hrsg. 2009. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Application guide. Springer Verlag.
- Liehr T, Claussen U. 2002. Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med*, 2:283–297.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. 2002. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med*, 9:335–339.
- Liehr T, Starke H, Heller A, Kosyakova N, Mrasek K, Gross M, Karst C, Steinhäuser U, Hunstig F, Fickelscher I, Kuechler A, Trifonov V, Romanenko S, Weise A. 2006. Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cytogenet Genome Res*, 114:240–4.
- Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol*, 19:229–37. Review.
- Ludes-Meyers J, Bednarek A, Popescu N, Aldaz MBC. 2003. WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res*, 100:101–10.
- Lukusa T, Meulepas E, Fryns J, den Berghe HV, Cassiman J. 1991. “Spontaneous” FRA16B is a hot spot for sister chromatid exchanges. *Hum Genet*, 87:583–6.
- Malcolm S, Barton P, Murphy C, Ferguson-Smith M. 1981. Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization: human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet*, 45:135–141.
- du Manoir S, Speicher M, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. 1993. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*, 90:590–610.
- Miró R, Clemente I, Fuster C, Egozcue J. 1987. Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. *Hum Genet*, 75:345–9.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2009. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

LITERATURVERZEICHNIS

- Mohr B, Bornhauser M, Thiede C, Schakel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U, Ehnin-
ger G. 2000. Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in
39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia*,
14:1031–1038.
- Mrasek K. 2009. Identifizierung und Charakterisierung von „fragile sites“ und Vergleich
mit Neoplasie-assoziierten und evolutionär fixierten Chromosomenbruchpunkten der
Hominidae. PhD-Thesis in press.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic
amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb
Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–273.
- Nakagawa H, Lockman J, Frankel W, Hampel H, Steenblock K, Burgart L, Thibodeau
S, de la Chapelle A. 2004. Mismatch Repair Gene PMS2: Disease-Causing Germline
Mutations Are Frequent in Patients Whose Tumors Stain Negative for PMS2 Prote-
in, but Paralogous Genes Obscure Mutation Detection and Interpretation. *Cancer
Research*, 64:4721–4727.
- Nowell P, Croce C. 1988. Chromosomal approaches to oncogenes and oncogenesis.
FASEB J, 2:3054–3060.
- Nowell P, Hungerford D. 1960. A minute chromosome in human granulocytic leukemia.
Science, 132:1497.
- Ozaki T, Neumann T, Wai D, Schäfer K, van Valen F, Lindner N, Scheel C, Böcker W,
Winkelmann W, Dockhorn-Dworniczak B, Horst J, Poremba C. 2003. Chromosomal
alterations in osteosarcoma cell lines revealed by comparative genomic hybridization
and multicolor karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet*, 140:145–52.
- Pardue M, Gall J. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of
cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64:600–604.
- Pedersen B, Jensen I. 1991. Clinical and prognostic implications of chromosome 5q
deletions: 96 high resolution studied patients. *Leukemia*, 5:566–73.
- Pedrazzini E, Mamaev N, Yakovleva T, Sukhikh T, Salido M, Solé F, Prat E, Camps
J, Miró R, Slavutsky I. 2003. Genomic rearrangements involving rDNA and cen-
tromeric heterochromatin in vulvar epidermoid carcinoma cell line A-431. *Cancer
Genet Cytogenet*, 143:50–8.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pinkel D, Straume T, Gray J. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:2934–2938.
- Pluciennik E, Kusińska R, Potemski P, Kubiak R, Kordek R, Bednarek A. 2006. WWOX—the FRA16D cancer gene: expression correlation with breast cancer progression and prognosis. *Eur J Surg Oncol*, 32:153–7.
- Polani P, Briggs J, Ford C, Clarke C, Berg J. 1960. A mongol girl with 46 chromosomes. *Lancet*, 1:721.
- Pätau K, Smith D, Therman E, Inborn S, Wagner H. 1960. Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. *Lancet*, 1:790–793.
- Rassool F, McKeithan T, Neilly M, van Melle E, 3rd RER, Beau ML. 1991. Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: an approach to cloning fragile sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:6657–61.
- Ried K, Finnis M, Hobson L, Mangelsdorf M, Dayan S, Nancarrow J, Woollatt E, Kremmidiotis G, Gardner A, Venter D, Baker E, Richards R. 2000. Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet*, 9:1651–1663.
- Rigby P, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol*, 113:237–251.
- Rossi M, Conroy J, McQuaid D, Nowak N, Rutka J, Cowell J. 2006. Array CGH analysis of pediatric medulloblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 45(3):290–303.
- Rozier L, El-Achkar E, Apiou F, Debatisse M. 2004. Characterization of a conserved aphidicolin-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with an inherited disease and cancer. *Oncogene*, 23:6872–6880.
- Rubtsov N, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Clausen U. 1996. Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet*, 97:705–709.

- Rudolph C, Liehr T, Steinemann D, Emura M, Daibata M, Matsuo Y, Emi N, Abe M, Lai R, Mrasek K, Claussen U, Schlegelberger B. 2006. Different breakage-prone regions on chromosome 1 detected in t(11;14)-positive mantle cell lymphoma cell lines and multiple myeloma cell lines are associated with different tumor progression-related mechanisms. *Cytogenet Genome Res*, 112(3-4):213–21.
- Ruiz-Herrera A, Garcia F, Fronicke L, Ponsa M, Egozcue J, Caldes M, Stanyon R. 2004. Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. *Chromosome Res*, 12:683–690.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 20:1350–1354.
- Salaverria I, Espinet B, Carrió A, Costa D, Astier L, Slotta-Huspenina J, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Solé F, Colomer D, Serrano S, Miró R, Beà S, Campo E. 2008. Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes Chromosomes Cancer*, 47:1086–97.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning Band 3*, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith M, Ning Y, Ledbetter D, Bar-Am I, Soenksen D, Ried YGT. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273:494–497.
- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2:971–972.
- Selzer R, Richmond T, Pofahl N, Green R, Eis P, Nair P, Brothman A, Stallings R. 2005. Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, 44(3):305–19.
- Senger G, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brondum-Nielsen K. 1997. Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenatal Diagnosis*, 17:369–374.

LITERATURVERZEICHNIS

- Senger G, Chudoba I, Plesch A. 1998. Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *BIOforum*, 9:499–503.
- Shaffer L, Tommerup N, Hrsg. 2005. *ISCN 2005, An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. S. Karger Verlag, Basel.
- Sheaff R, Ilsley D, Kuchta R. 1991. Mechanism of DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin. *Biochemistry*, 30:8590–7.
- Shizuya H, Birren B, Kim U, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Smon M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Aca Sci USA*, 89:8794–8797.
- Simmers R, Sutherland G. 1988. Further localization of ETS1 indicates that the chromosomal rearrangement in Ewing sarcoma does not occur at fra(11)(q23). *Hum Genet*, 78:144–7.
- Simmers R, Sutherland G, West A, Richards R. 1987. Fragile sites at 16q22 are not at the breakpoint of the chromosomal rearrangement in AMMoL. *Science*, 236:92–4.
- Speicher M, Ballard SG, Ward D. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*, 12:368–375.
- Spurbeck J, Zinsmeister A, Meyer K, Jalal S. 1996. Dynamics of chromosome spreading. *Am J Med Genet*, 61:387–393.
- Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner R, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. 2003. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet*, 114:51–67.
- Sutherland G. 1977. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, 197:265–266.
- Sutherland G, Simmers R. 1988. No statistical association between common fragile sites and nonrandom chromosome breakpoints in cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 31:9–15.
- Sutton W. 1903. The chromosome inheritance. *Biol Bull*, 4:231–248.

LITERATURVERZEICHNIS

- Telenius H, Carter N, Bebb C, Nordenskjold M, Ponder B, Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13:718–725.
- Tjio J, Levan A. 1956. The chromosome number in man. *Hereditas*, 42:1–6.
- Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley J, Ried T. 1997. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet*, 15:406–410.
- Verma R, Babu A. 1994. Human chromosomes: Principles and techniques. Zweite Aufl. McGraw-Hill, Inc.
- Waldeyer W. 1888. Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat*, 32:1–22.
- Wang L, Paradee W, Mullins C, Shridhar R, Rosati R, Wilke C, Glover T, Smith D. 1997. Aphidicolin-induced FRA3B breakpoints cluster in two distinct regions. *Genomics*, 41:485–8.
- Watson S, deLeeuw R, Horsman D, Squire J, Lam W. 2007. Cytogenetically balanced translocations are associated with focal copy number alterations. *Hum Genet*, 120(6):795–805.
- Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel B, Claussen U, Liehr T. 2003. Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res*, 103:34–39.
- Weise A, Liehr T, Efferth T, Kuechler A, Gebhart E. 2002. Comparative M-FISH and CGH analyses in sensitive and drug-resistant human T-cell acute leukemia cell lines. *Cytogenet Genome Res*, 98(2-3):118–25.
- Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung S, Cai W, Liehr T, Kosyakova N. 2008. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem*, 56:487–93.
- Yunis J, Soreng A. 1984. Constitutive Fragile Sites and Cancer. *Science*, 226:1199–1204.

LITERATURVERZEICHNIS

Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, Ben-Porat N, Ozeri E, Hershberg R, Levi A, Scherer S, Margalit H, Kerem B. 2003. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol Cell Biol*, 23:7143–7151.

Elektronische Datenbanken

Access Excellence Resource Center:

<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/fish.php>

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology:

<http://atlasgeneticsoncology.org>

CyDAS:

<http://www.cydas.org/>

Database of Genomic Variants:

<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH:

<http://www.dsmz.de/>

Human Genome Project:

<http://www.gdb.org/hugo/>

Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer:

<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

National Center for Biotechnology Information (NCBI), NCBI Map Viewer:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606

RepeatMasker:

<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>

UCSC:

<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg18&hgsid=128687189>

A. Anhang

Vergleich Tumorbruchpunkte und Fragile Sites

Siehe nächste Seite.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
1p36	der(1)t(1;14)(p36.3;q11)del(1)(p31p13)t(1;12) (q21.2~q22;q24.1)	~15.630 kbp (proximale Grenze)	Granta-519	FRA1A	12.112–14.890 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, Übereinstimmung
1q21	der(1)t(1;14)(p36.3;q11)del(1)(p31p13)t(1;12) (q21.2~q22;q24.1)	~154.400 kbp (proximale Grenze)	Granta-519	FRA1F	146.154–148.888 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, keine Übereinstimmung
4q22	der(6)t(6;4)(q15;q22)	~98.600 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA4F	89.514–97.532 kbp	(Rozier et al. 2004)	BP liegt distal von FS, Übereinstimmung
4q22	der(6)t(6;4)(q15;q22)	~98.600 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA4F	88.364–94.011 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, fragliche Übereinstimmung
5p14	t(5;12)(p14;q12)x2	nicht im Bereich 17.465 kbp	NCEB-1	FRA5E	17.465 kbp	(Ruiz-Herrera et al. 2004)	keine Übereinstimmung, exakte Lage BP aber unklar

Tabelle A.1.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
7p22	der(14)ins(7;14)(p22;q11)	~6.800 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA7B	5.915 kbp	(Ruiz-Herrera et al. 2004)	BP liegt proximal von FS, Übereinstimmung
7p22	der(14)ins(7;14)(p22;q11)	~6.800 kbp (proximale Grenze)	LNCaP	FRA7B	3.527–5.845 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, Übereinstimmung
7p15	t(1;7)(?;p14)/ t(6;7)(q22;p14), neu:7p15	28.000–32.000 kbp (proximale Grenze)	06088/ 95156	keine FS bekannt	-	-	-
7q22	der(7)t(7;?)(q22;?)	99.700 kbp (proximale Grenze)	COLO320	FRA7F	106.822 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung

Tabelle A.1.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
8q24	der(8)i(8)(qter→q10::q10→q24::hsr::q24→qter)	~138.000 kbp (distale Grenze)	HT29	FRA8C	128.120 kbp, 128.490 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, keine Übereinstimmung
9q13	t(9;1)(q22;?),neu: 9q13	70.320.668–70.406.895 bp	05456	FRA9J	-	(Mrasek 2009)	ist bisher nur zytogenetisch kartiert
9q21	der(6;9)t(6;9;X;9)(6pter→6q10::9q10→9q21::Xp21.1→Xp11.3::9q21→9qter)	~77.500–78.000 kbp (distale Grenze)	HT29	FRA9K	-	(Mrasek 2009)	ist bisher nur zytogenetisch kartiert
9q22	del(9)(q22q32)	~86.000 kbp (distale Grenze)	04336	FRA9D	97.106 kbp	(Ferber et al. 2003)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung

Tabelle A.1.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

zytogen. Lage	zytogenetische Chromosomenveränderung	molekularzytogenet. Kartierung Tumorbruchpunkt start-stop	Zelllinie/ Fall	FS	molekularzytogenet. Kartierung FS start-stop	Referenz	Lage Tumorbruchpunkt zu FS
9q22	del(9)(q22q32)	~86.000 kbp (distale Grenze)	04336	FRA9D	87.398–87.753 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung
16q22	inv(16)(p13q22)	nicht zw. 68.500–72.000 kbp (BP vermutlich proximal davon)	07134	FRA16C	68.592–72.036 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt proximal von FS, keine Übereinstimmung
17q23	t(1;17)(p36.3;q23)	57.418.528–57.650.888 bp	98211	FRA17B	55.254 kbp	(Mrasek 2009)	BP liegt distal von FS, Übereinstimmung

Tabelle A.1.: Auflistung sämtlicher in dieser Arbeit molekularzytogenetisch kartierter Tumorbruchpunkte im Vergleich zu den Fragile Sites der entsprechenden zytogenetischen Bande.

Abstandsvergleich zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites

zytog. Lage	Lage Tumorbruchpunkt	Lage FS	Abstand
1p36	~15.630 kbp (proximale Grenze)	12.112–14.890 kbp	~ 1 Mbp
1p36	12.912–12.937 kbp	12.112–14.890 kbp	~ 0 Mbp
1p22	100.997–101.176 kbp	88.092 kbp	~ 2 Mbp
1q21	~154.400 kbp (proximale Grenze)	146.154–148.888 kbp	~ 6 Mbp
1q31	193.462.500–193.637.500 bp	184.235 kbp	~ 9 Mbp
2p13	75.062–75.132 kbp	67.154 kbp	~ 8 Mbp
4q21	75.380–75.737 kbp	84.003–86.360 kbp	~ 9 Mbp
4q22	~98.600 kbp (proximale Grenze)	89.514–97.532 kbp	~ 1 Mbp
4q22	~98.600 kbp (proximale Grenze)	88.364–94.011 kbp	~ 4 Mbp
4q31	147.707–148.112 kbp	144.127–148.075 kbp	~ 0 Mbp
5q35	173.012.500–173.137.500 bp	171.047–171.955 kbp	~ 1 Mbp
6q15	91.702–92.013 kbp	93.297 kbp	~ 1 Mbp
6q15	87.407–87.595 kbp	93.297 kbp	~ 5 Mbp
7p22	6.662.500–6.787.500 bp	5.915 kbp	~ 0,8 Mbp
7p22	6.662.500–6.787.500 bp	3.527–5.845 kbp	~ 0,8 Mbp
7q22	99.700 kbp (proximale Grenze)	106.822 kbp	~ 7 Mbp
7q34	143.337.500–143.462.500 bp	139.131–144.233 kbp	~ 0 Mbp
8q24	~138.000 kbp (distale Grenze)	128.120 kbp, 128.490 kbp	~ 10 Mbp
9q22	~86.000 kbp (distale Grenze)	97.106 kbp	~ 11 Mbp
9q22	~86.000 kbp (distale Grenze)	87.398–87.753 kbp	~ 1,3 Mbp
10q11.2	46.337.500–47.162.500 bp	45.577–46.174 kbp	~ 0,2 Mbp
13q21	67.214–67.382 kbp	60.475–64.789 kbp	~ 3 Mbp
16q22	69.412.500–69.787.500 bp	63.914 kbp	~ 3 Mbp
16q22	69.412.500–69.787.500 bp	68.592–72.036 kbp	~ 0 Mbp
17q23	57.418.528–57.650.888 bp	55.254 kbp	~ 2 Mbp

Tabelle A.2.: Angabe der Abstände zwischen Tumorbruchpunkten und Fragile Sites.

Auflistung aller genutzten BACs

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
11p11	RP11-79A4	48644475–48801171	AQ282359.1, AQ282362.1, AQ580435.1, AQ628770.1, AZ519136.1
11p13	RP11-151O13	31529588–31709387	AQ377123.1, AQ377120.1
11p13	RP1-17K7	31922313–32052548	AL035078.32
11p13	RP1-85M6	32976955–33121104	AC087716.1, AL121926.24
11p13	RP1-316D7	33473026–33603892	AC135057.1, AL049575.7
11p13	RP13-786C16	33841462–33985492	AC132216.7
11p13	RP11-350D17	34538621–34690046	AC087783.10
11p14	RP11-302O8	30662359–30689138	AC026844.4
11p15	RP11-261I18	21513425–21681734	AQ483542.1, AQ483543.1
11q14	RP11-97D10	88680082–88847587	AQ320490.1, AQ320493.1
11q14	RP11-529A4	89286313–89446995	AP004607.4
16q22	RP11-63M22	65183598–65333456	AC018557.9
16q22	RP11-297D21	65900228–66095618	AC009061.10
16q22	RP11-120G17	66655003–66809694	AQ349181.1, AQ349179.1
16q22	RP11-76H6	67133750–67134326	AQ284432.1
16q22	RP11-99A10	67577752–67751653	AQ322460.1, AQ322459.1
16q22	RP11-311C24	68224900–68296604	AC012321.8
16q22	RP11-779G13	68242800–68394830	AQ495106.1, AQ756040.1
16q22	RP11-419C5	68412763–68413173	AQ550189.1
16q22	RP11-106J23	68544071–68544389	AQ324058.1
16q22	RP11-23E19	69575824–69728676	B86441.1, B86442.1
16q22	RP11-1145B23	69726184–69887906	AQ752754.1, AQ751756.1
16q22	RP11-510M2	69991371–70168705	AC010547.9
16q22	RP11-140I24	71883293–72036034	AC009033.10

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
17q23	RP11-112J9	51993135–52172785	AQ343302.1, AQ313112.1
17q23	RP11-19F16	52616469–52760781	AC007644.1
17q23	RP11-506H21	53510740–53672821	AC005962.1
17q23	RP11-142B17	54021963–54195757	AQ385987.1, AQ385990.1
17q23	RP11-567L7	54696369–54872934	AC091059.12
17q23	RP11-165E2	55513306–55513938	AQ381547.1
17q23	RP11-105G8	55904414–56060400	AQ347448.1, AQ317907.1
17q23	RP11-113J9	56558188–56743204	AQ342529.1, AQ342531.1
17q23	RP11-342K2	57418528–57473361	AC018628.13
17q23	RP11-51L5	57650482–57650888	AQ052345.1
17q23	RP11-1072L2	58112717–58113186	AQ676804.1
17q23	RP11-156L14	58237316–58237821	AQ389945.1
17q23	RP11-995E13	58504729–58505365	AQ801028.1
17q23	RP11-1010P17	58815831–58816337	AQ727259.1
17q23	RP11-579K23	59104449–59288441	AQ332222.1, AQ332451.1
17q23	RP11-89H15	59472574–59627204	AQ284720.1, AQ284719.1
17q23	RP11-473J13	59672578–59672952	AZ517521.1
17q23	RP11-1077E6	59974551–59975466	AQ744981.1
17q23	RP11-451L20	60241919–60242435	AQ587114.1
17q23	RP11-898O16	60513144–60513472	AQ835580.1
1p35	RP11-84A19	31987758–32110170	AL354919.16
1p36.1	RP11-344F13	14546508–14547223	AQ541892.1
1p36.1	RP11-227B14	15064827–15123248	AL445263.6
1p36.1	RP11-408B19	15123249–15241799	AL391215.12
1p36.1	RP4-560M15	15452323–15479432	AL158174.8
1p36.1	RP11-265F14	15630693–15811097	AL512883.5, AQ487082.1
1p36.1	RP4-745E8	20480153–20558818	AL020998.1

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
1p36.1	RP1-184J9	23210536–23311486	AL031428.9
1p36.2	RP11-829B14	10964422–11158005	AQ813960.1, AQ792829.1
1p36.2	RP11-514N2	12526801–12583490	AL645761.8
1p36.2	RP5-845O24	12778691–12897788	AL022101.1
1p36.2	RP11-219C24	13245159–13429749	AL365443.16
1p36.2	RP11-19M4	14690901–14781334	AL358793.14
1p36.2	RP1-243L18	14779335–14891169	AL034395.6
1p36.2	RP3-410I8	14812419–14958908	AL031732.8
1p36.2	RP5-864I18	14958809–15064826	AL031293.1
1p36.2	RP3-438L4	7059893–7186726	Z97635.10
1p36.2	RP11-338N10	7653186–7719107	AL359881.28
1q21	RP11-326G21	143643010–143768403	AL590452.12
1q21	RP11-94I2	144594476–144760573	AL356004.9
1q21	RP11-44P6	145573363–145574134	AQ198228.1
1q21	RP11-157I11	146577762–147221084	AQ371907.1, AQ371905.1
1q21	RP11-356M24	147926726–148105558	AQ537539.1, AQ537538.1
1q21	RP11-54A4	148711839–148894833	AL356356.17, AQ082672.1
1q21	RP11-98D18	149916734–150100344	AQ319340.1, AQ319337.1
1q21	RP11-216N14	151954673–152104838	AL513523.33
1q21	RP11-307C12	153110663–153292828	AL451085.20
1q21	RP11-98F1	153411307–153411959	AQ321667.1
1q22	RP11-172I6	154398686–154399179	AQ414376.1
4p15	RP11-280K20	31500913–31663969	AQ504387.1, AQ504389.1
4p15	RP11-395J1	32527753–32671334	AC116630.4
4p15	RP11-143G24	34578448–34725425	AQ389797.1, AQ389792.1
4q22	RP11-9B6	93421437–93529296	AC112695.3
4q22	RP11-428L21	93902995–94010580	AC095059.3

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
4q22	RP11-354C17	96994092–97153593	AZ517813.1, AQ530704.1
4q22	RP11-448B7	97445853–97446381	AQ581387.1
4q22	RP11-122F6	97848484–98028115	AQ344253.1, AZ520228.1
4q22	RP11-297E12	98333995–98334710	AQ503610.1
4q22	RP11-242D9	98622890–98832379	AC034154.6
4q22	RP11-240J11	98983029–98983865	AQ482728.1
4q22	RP11-428B4	99887454–100074914	AC093836.3
5p14	RP11-697E23	20701859–20867335	AC138938.2
5p14	RP11-704G19	21839606–22021910	AC138940.3
5p14	RP11-823P9	21371518–21565392	AC138951.2
5p15.1	RP1-137K24	15193325–15315356	AC016648.5
5p15.1	RP11-19O2	16193688–16358450	B89555.1, B81984.1
5p15.1	RP1-167G20	16358454–16529263	AC020980.6
5p15.1	RP11-21H5	16365884–16546950	B83987.1, B83986.1
5p15.1	RP11-260E18	16623402–16775309	AQ486951.1, AQ486949.1
5p15.1	RP11-90B23	16794684–16968719	AQ283571.1, AQ283568.1
5p15.1	RP11-553J15	17110352–17284398	AC022936.2
5p15.1	RP11-321E2	17433650–17583651	AC106774.2
5p15.1	RP11-88L18	17465560–17588527	RP11-88L18
5p15.2	RP11-472K20	14067604–14067871	AQ633690.1
5p15.2	RP11-415K6	14596515–14596991	AQ554117.1
5q15	RP11-418P19	100759797–100938620	AQ548111.1
5q15	RP11-93O17	98789690–98917493	AC114324.2
5q15	RP11-954D2	98836841–99018981	AQ623998.1, AQ683126.1
5q15	CTD-2068C11	99850207–100001708	AC010382.4
6q25	RP3-442A17	158818064–158854413	AL353800.10
6q25	RP11-100E6	155961815–156122697	AQ322013.1, AQ341984.1

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
6q25	RP3-336G18	156885767–157054887	AL158033.18
6q25	RP11-266C7	158244857–158440761	AL139330.17, AQ488078.1, AQ488081.1
6q26	RP11-13P5	159404595–159586453	AL356417.17, B75190.1, B75191.1
6q26	RP1-249F5	160224241–160354108	AL035691.17
6q26	RP11-288H12	160354109–160500259	AL353625.5
6q26	RP3-366M24	160619320–160702238	AL355506.23
6q26	RP11-414A5	160859306–160991056	AL596089.19
6q26	RP11-235G24	161174902–161273963	AL391361.18
6q26	RP11-421L20	161718437–161773070	AL445215.7
6q26	RP11-262E15	161961565–162129840	AQ487752.1, AQ487755.1
6q26	RP11-159M9	162327379–162488949	AQ375762.1, AQ375761.1
6q26	RP11-266I4	162793648–162955035	AQ490082.1, AQ490083.1
6q26	RP11-514O12	167115548–167268485	AL159163.40
7p14	RP11-89N17	33718642–33897263	AQ284915.1, AQ284918.1
7p14	RP11-179B11	34143505–34144329	AQ418284.1
7p14	RP11-178P2	35220221–35343343	AC009531.11
7p14	RP11-379H18	35604420–35754541	AC018647.5
7p14	RP11-155G7	36168081–36309869	AC007327.1
7p14	RP11-155G7	36168081–36309869	AC007327.1
7p14	RP11-7P19	36578422–36736321	AC087069.3
7p14	RP11-59F6	37373048–37482195	AC078843.2
7p14	RP11-302L6	37482196–37597749	AC009530.5
7p14	RP11-302L6	37596962–37597573	CC737334.1
7p14	RP11-3P18	37597750–37734325	AC083860.2
7p14	RP11-605P22	37734326–37825116	AC083865.2

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
7p14	RP11-121A8	38185252–38357043	AQ343517.1, CC737331.1
7p14	RP4-740L10	38611493–38735588	AC005247.2
7p15	RP11-643O8	28143746–28366479	RP11-643O8
7p15	RP4-596O9	28459769–28603446	AC003074.3
7p15	RP11-88B20	28753261–28917493	AQ286608.1, AQ286611.1
7p15	RP11-550A18	29467570–29624461	AC007255.4
7p15	RP11-111I9	30200328–30382206	AQ321867.1, AQ321869.1
7p15	RP5-1143H19	30620391–30747615	AC004976.1
7p15	RP11-143B19	31046534–31200389	AQ371792.1, AQ371794.1
7p15	RP11-313D21	31536482–31695336	AQ506254.1, AQ528009.1
7p15	RP11-175P8	32458563–32459539	CC875166.1
7p21	RP11-79G16	13212182–14328128	AQ581376.1
7p22	RP11-348A21	3449750–3649897	AQ543542.1, AQ543539.1
7p22	RP11-300J8	4488105–4488579	AQ504118.1
7p22	RP11-172O13	5691552–5692214	AQ413536.1
7p22	RP4-810E6	6049510–6200436	AC004895.2
7p22	RP11-425P5	6233987–6446613	AC009412.6
7p22	RP11-1080O3	6392079–6613748	AQ744007.1, AQ740555.1
7p22	RP11-611L7	6620917–6792883	AC073343.6
7p22	RP11-577O18	6792884–6850310	AC079882.6
7p22	RP11-299B12	6872516–7088026	AQ505610.1, AQ505612.1
7p22	RP11-460K7	7227941–7420346	AQ633429.1, AQ633430.1
7p22	RP5-1111L2	7307412–7460417	AC006356.3
7p22	RP11-21F22	7501535–7502083	B85889.1
7p22	RP11-505D17	7947759–8125919	AC006042.2
7q21	RP11-356B17	96800895–96907086	AC007316.4
7q21	RP11-756B4	97206171–97206774	RP11-756B4

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
7q21	RP11-380G21	97314221–97485962	AQ534375.1, AQ534372.1
7q21	RP11-380G21	97362822–97410111	AC079781.7
7q22	RP11-333G13	101305935–101346478	AC092788.3
7q22	RP11-577H5	102065130–102200407	RP11-577H5
7q22	RP11-1134K14	102083629–102241299	AQ733310.1, AQ707388.1
7q22	RP11-35A7	102517788–102658458	AQ045714.1, AQ045716.1
7q22	RP11-960F1	102785215–102786112	AQ742561.1
7q22	RP11-325F22	104274175–104444816	AC007384.3
7q22	RP5-1106G10	105320353–105398795	AC004964.2
7q22	RP11-22N19	105583835–105763437	AC007032.2, AQ009346.1, B86357.1
7q22	RP11-17I10	105949351–105950008	B83665.1
7q22	RP5-892G19	106063614–106173646	AC004917.2
7q22	RP11-258L19	106376206–106539645	AQ479848.1, AQ479850.1
7q22	RP11-473L8	106745073–106924300	AQ632978.1, AQ632975.1
7q22	RP4-673O11	106747568–106822183	AC004855.1
7q22	RP11-143N19	106912082–107080719	AQ372433.1, AQ372432.1
7q22	RP11-266C11	107126876–107307938	AQ488093.1 AQ488090.1
7q22	RP11-443I10	107429108–107433634	AC078853.9
7q22	RP11-77E2	107305452–107472899	AQ286856.1, AQ286857.1
7q22	RP11-238I13	108884648–109038857	AC073071.2
7q22	RP11-718D16	109192158–109316792	AC073139.6
7q22	RP5-905M6	110866834–110973079	AC005166.1
7q22	RP11-358A10	110005952–110164580	AC073326.6
7q22	RP11-189E18	110973080–111007307	AC092613.2
7q22	RP11-807L7	111424246–111424916	AQ523329.1
7q22	RP11-253F8	98370949–98542296	CC470864.1, CC470863.1

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
7q22	RP11-313E18	98746932–98922844	AQ527929.1, AQ506013.1
7q22	RP11-114P12	98844418–99008868	AQ343205.1, AQ343208.1
7q22	RP11-204M9	99410498–99593067	AQ414874.1, AQ414877.1
7q22	RP11-506M12	99507489–99700793	AC073842.5
7q22	RP11-44M6	99873580–99874179	AQ202595.1
7q31	RP11-92J13	111426904–111594377	RP11-92J13
7q31	RP11-328M22	112279363–112435024	AC018464.9
7q31	RP11-467K21	112371391–112555864	AZ516783.1, AQ629102.1
7q31	RP11-354H2	115640166–115640819	AQ532868.1
7q34	RP11-298A10	142664612–142864734	AC073264.5
7q34	RP4-807C15	143834363–143952114	AC004743.1
7q34	RP11-307I2	143102265–143209337	AC099548.6
7q34	RP4-669B10	143246098–143373452	AC004853.1
8q24.1	RP11-115M9	122743719–122893617	AQ344516.1, AQ344518.1
8q24.1	RP11-96B2	123525928–123697987	AQ314793.1, AQ314795.1
8q24.1	RP11-532M24	125653378–125840521	AC090922.4
8q24.1	RP11-255B23	128118319–128291914	AC020688.7
8q24.2	RP11-3O20	130338932–130500014	AQ316779.1, B48899.1
8q24.2	RP11-668K2	133725504–133725989	RP11-668K2
8q24.2	RP11-21H16	135975000–136155000	RP11-21H16
8q24.2	RP11-343P9	136652507–136653413	AQ538844.1
8q24.2	RP11-17M8	137773472–137919464	AC013646.6, B81866.1, B82798.1
8q24.2	RP11-356M23	137978911–137979640	AQ535424.1
8q24.2	RP11-172M18	139337209–139453265	AC087711.5
8q24.2	RP11-526P7	140286861–140443685	AC053480.5
8q24.3	RP11-620H1	145739624–145740218	AQ404876.1

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
8q24.3	RP11-639O3	146038513–146236298	AQ433761.1, AQ435862.1
9q12	RP11-391M20	66812701–66987465	AL591385.7
9q12	RP11-12A20	67288071–67480316	AL627230.15
9q12	RP11-229G4	67708435–67709057	AQ487625.1
9q12	RP11-460N11	68991241–69156714	AL359955.25
9q12	RP11-21H4	69118555–69291653	BX001034.6
9q13	RP11-460E7	69745392–69746352	AQ633014.1
9q13	RP11-561O23	70025289–70198279	AL353608.20
9q13	RP11-88I18	70163371–70343347	AQ285872.1, AQ285875.1
9q13	RP11-274B18	70320668–70488660	AL353616.14
9q13	RP11-639J8	70406270–70406895	AQ521888.1
9q13	RP11-203L2	70488661–70642631	AL354794.16
9q13	RP11-430C15	70555881–70556393	AQ551617.1
9q21	RP11-16N10	70969027–71136721	B82556.1, B83639.1
9q21	RP11-373A9	71898094–72097640	AL158153.10
9q21	RP11-71A24	74808547–74809102	AQ239848.1
9q21	RP11-401G5	75586335–75757100	AL513124.9
9q21	RP11-66O21	77399685–77400494	AQ195891.1
9q21	RP11-360J12	77506706–77683583	AL157883.15, AZ519646.1
9q21	RP11-428L19	77683584–77871191	AL359253.17
9q21	RP11-652B19	77839349–78010361	AL353607.20, AQ438001.1
9q21	RP11-468J21	77964254–78156103	BH367018.1, BH152865.1
9q21	RP11-422N19	78113661–78213797	AL391868.16
9q21	RP11-79G7	79580000–79757000	RP11-79G7
9q21	RP11-362L2	81427153–81446829	AL445252.13
9q21	RP11-66D1	82951738–83098662	AQ241217.1, AQ241214.1
9q21	RP11-541F16	84667734–84783005	AL359202.16

Tabelle A.3.: Fortsetzung und Legende auf der nachfolgenden Seite.

ANHANG

zytog. Lage	BAC	BAC-Kartierung (bp start-stop)	AC/ AL
9q21	RP11-439A18	85292903–85375534	AL450026.10
9q21	RP11-522I20	85375535–85544238	AL354920.21
9q21	RP11-162J2	85544239–85605843	AL662787.6
9q21	RP11-346I8	85762165–85964664	AC012279.5, AL732446.4, AQ542368.1, AQ542366.1
9q21	RP11-280C11	86035915–86177955	AQ508792.1, AQ508789.1
9q21	RP11-133I2	86158135–86288330	AZ521547.1, AQ384812.1
9q21	RP11-59M22	86180525–86337480	AL157886.13, AQ202266.1, AQ202270.1
9q21	RP11-172F7	87076588–87248611	AL583827.7
9q22	RP11-202I11	87570153–87570745	AQ413860.1
9q22	RP11-350E12	87746467–87953761	AQ529936.1, AQ529933.1
9q32	RP11-382H18	117122921–117164826	AL731824.5

Tabelle A.3.: Angabe aller verwendeten BAC-Sonden mit deren Lagekartierung.

Vollständige Sequenzanalysen

Fall 05456

	number of elements	length occu- pied	percentage of sequence	average healthy sequence (International Human Sequencing Consortium 2001)
SINEs:	46	10955 bp	12.70 %	13,10%
ALUs	27	8073 bp	9.36 %	10,60%
MIRs	19	2882 bp	3.34 %	2,20%
LINEs:	31	16746 bp	19.42 %	20,40%
LINE1	18	14406 bp	16.71 %	16,90%
LINE2	11	2132 bp	2.47 %	3,20%
L3/CR1	2	208 bp	0.24 %	0,30%
LTR elements:	15	5820 bp	6.75 %	8,30%
ERVL-MaLRs	7	2987 bp	3.46 %	3,70%
ERV_classI	0	0 bp	0.00 %	2,90%
ERV_classII	0	0 bp	0.00 %	0,30%
DNA elements:	26	5436 bp	6.30 %	2,80%
hAT-Charlie	18	3124 bp	3.62 %	1,40%
TcMar-Tigger	4	1327 bp	1.54 %	1,00%
Unclassified:	0	0 bp	0.00 %	0,10%
Total intersper- sed repeats:		38957 bp	45.18 %	44,80%

Tabelle A.4.: Vollständige Sequenzanalyse des Falles 05456.

Fall 98211

	number of elements	length occu- pied	percentage of sequence	average healthy sequence (International Human Sequencing Consortium 2001)
SINEs:	301	79928 bp	34.40 %	13,10%
ALUs	272	76248 bp	32.81 %	10,60%
MIRs	29	3680 bp	1.58 %	2,20%
LINEs:	73	27396 bp	11.79 %	20,40%
LINE1	47	20956 bp	9.02 %	16,90%
LINE2	20	5160 bp	2.22 %	3,20%
L3/CR1	5	906 bp	0.39 %	0,30%
LTR elements:	37	17503 bp	7.53 %	8,30%
ERV _L -MaLRs	20	7518 bp	3.24 %	3,70%
ERV _{classI}	5	2153 bp	0.93 %	2,90%
ERV _{classII}	0	0 bp	0.00 %	0,30%
DNA elements:	30	6143 bp	2.64 %	2,80%
hAT-Charlie	19	3778 bp	1.63 %	1,40%
TcMar-Tigger	3	774 bp	0.33 %	1,00%
Unclassified:	3	1546 bp	0.67 %	0,10%
Total intersper- sed repeats:		132516 bp	57.03 %	44,80%

Tabelle A.5.: Vollständige Sequenzanalyse des Falles 98211.

Genbeschreibungen ausgewählter Gene

PGM5: phosphoglucomutase 5

GeneID: 5239

Phosphoglucomutases , such as PGM5, are phosphotransferases involved in interconversion of glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate. PGM activity is essential in formation of carbohydrates from glucose-6-phosphate and in formation of glucose-6-phosphate from galactose and glycogen (Edwards et al. 1995).

MED13: mediator complex subunit 13

GeneID: 9969

This gene encodes a component of the mediator complex (also known as TRAP, SMCC, DRIP, or ARC), a transcriptional coactivator complex thought to be required for the expression of almost all genes. The mediator complex is recruited by transcriptional activators or nuclear receptors to induce gene expression, possibly by interacting with RNA polymerase II and promoting the formation of a transcriptional pre-initiation complex. The product of this gene is proposed to form a sub-complex with MED12, cyclin C, and CDK8 that can negatively regulate transactivation by mediator (NCBI).

FRMD3: FERM domain containing 3

GeneID: 257019

Protein 4.1 of red blood cells, or 4.1R (EPB41; MIM 130500), is a multifunctional protein essential for maintaining erythrocyte shape and membrane mechanical properties. The protein 4.1 family comprises a group of structural proteins that includes, in addition to 4.1R, 4.1G (general type; MIM 603237), 4.1B (brain type; MIM 605331), 4.1N (neuron type; MIM 602879), and 4.1O (ovary type) (NCBI).

Fragile Sites

FS	zytogen. Lage	molekularzytogenetische Kartierung (start-stop)	Referenz
FRA1A	1p36	12.112–14.890 kbp	(Mrasek 2009)
FRA1D	1p22	88.092 kbp	(Ruiz-Herrera et al. 2004)
FRA1F	1q21	146.154–148.888 kbp	(Mrasek 2009)
FRA1K	1q31	184.235 kbp	(Mrasek 2009)
FRA2E	2p13	67.154 kbp	(Mrasek 2009)
FRA4I	4q21	84.003–86.360 kbp	(Mrasek 2009)
FRA4F	4q22	88.364–94.011 kbp	(Mrasek 2009)
FRA4C	4q31	144.127–148.075 kbp	(Mrasek 2009)
FRA5E	5p14	17.465 kbp	(Ruiz-Herrera et al. 2004)
FRA5G	5q35	171.047–171.955 kbp	(Mrasek 2009)
FRA6G	6q15	93.297 kbp	(Mrasek 2009)
FRA7B	7p22	3.527–5.845 kbp	(Mrasek 2009)
FRA7F	7q22	106.822 kbp	(Mrasek 2009)
FRA7M	7q34	139.131–144.233 kbp	(Mrasek 2009)
FRA8C	8q24	128.120 kbp, 128.490 kbp	(Ferber et al. 2003)
FRA9J	9q13	ist bisher nur zytogenetisch kartiert	(Mrasek 2009)
FRA9K	9q21	ist bisher nur zytogenetisch kartiert	(Mrasek 2009)
FRA9D	9q22	87.398–87.753 kbp	(Mrasek 2009)
FRA10G	10q11.2	45.577–46.174 kbp	(Mrasek 2009)
FRA13C	13q21	60.475–64.789 kbp	(Mrasek 2009)
FRA16C	16q22	63.914 kbp	(Mrasek 2009)
FRA17B	17q23	55.254 kbp	(Mrasek 2009)

Tabelle A.6.: Auflistung aller zum Vergleich genutzten Fragile Sites mit molekularzytogenetischer Kartierung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katja Behr
Geburtsdatum	05.09.1983
Geburtsort	Jena

Schulbildung

1990– 1994	Grundschule Theodor-Neubauer Jena
1994– 2000	Adolf-Reichwein Gymnasium Jena
2000– 2003	Staatliches berufsbildendes Schulzentrum Jena-Göschwitz, Fachrichtung Gesundheit u. Soziales
2003	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

ab Okt. 2003	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, voraussichtlicher Abschluss Ende 2010
Okt. 2006– Okt. 2007	Promotionsstipendium des IZKF am Institut für Humangenetik Jena

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, deren Unterstützung ich während der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit erfahren habe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat./med. habil T. Liehr für seine hilfsbereite Unterstützung, die vielen praktischen Anregungen und Diskussionen und für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit im FISH-Labor des Instituts für Human-genetik Jena.

Weiterhin möchte ich Frau Dipl.-Biol. K. Mrasek und Frau Dr. rer. nat. A. Weise für die praktische Betreuung und stetige Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit danken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die mich während der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonderer Dank gilt hier Frau M. Ziegler, Dipl.-Humanbiol. S. Hinreiner, Dr. rer. nat. M. Groß, Dipl.-Biol. V. Klaschka, E. Ewers (M.Sc.), Dipl.-Biol. D. Reich, Dr. H. Mkrtchyan, Dr. N. Kosjakowa und Dipl.-Biol. I. Fickelscher für viele anregende Diskussionen, praktische Tipps und eine ausgesprochen gute Atmosphäre im Labor.

Für die Aufarbeitung der Zellsuspensionen gilt mein Dank Frau Susanne Michel.

Herrn Dr. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie Jena danke ich für die Bereitstellung des verwendeten DOP-Primers.

Darüber hinaus möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums bei der IZKF Jena bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Jana Schwarzmann für das Korrekturlesen und im Besonderen meinem Freund Jörg Müller Hipper für die geduldige Unterstützung und sowohl technische als auch konzeptionelle Hilfestellung während aller Phasen der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dipl.-Biol. K. Mrasek, PD Dr. rer. nat./med. habil. T. Liehr, Dr. rer. nat. A. Weise,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 05.08.2009

.....
Katja Behr